



Réponses adaptatives des communautés bactériennes telluriques aux métaux et métalloïdes : liens avec la disponibilité des polluants métalliques dans les sols

Jessica Poirel

► To cite this version:

Jessica Poirel. Réponses adaptatives des communautés bactériennes telluriques aux métaux et métalloïdes : liens avec la disponibilité des polluants métalliques dans les sols. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0164 . tel-01750344

HAL Id: tel-01750344

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750344>

Submitted on 21 Sep 2020

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>

THESE
Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur en Géosciences

de l'Université de Lorraine, Collégium Sciences et Technologies
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Par **Jessica POIREL**

Réponses adaptatives des communautés bactériennes telluriques aux métaux et métalloïdes : liens avec la disponibilité des polluants métalliques dans les sols

Soutenance publique le 16 septembre 2013, devant le jury :

Rapporteurs	Mme Marie-Claire LETT	Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg I
	M. Laurent QUILLET	Maître de conférences, Université de Rouen, Mont Saint Aignan
Examineurs	Mme Catherine JOULIAN	Chargée de recherche, BRGM, Orléans
	M. Michael DuBow	Professeur, Université Paris-Sud 11
Invitée	Mme Cécile GRAND	Ingénieur, ADEME, Angers
Directrice de thèse	Mme Corinne LEYVAL	Directrice de recherche, CNRS, Université de Lorraine
Co-directeur de thèse	M. Patrick BILLARD	Maître de conférences, Université de Lorraine

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Mme Marie-Claire Lett, Mr Laurent Quillet, Mr Dubow Michael et Mme Catherine Joulian de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury de thèse et d'avoir pris le temps de lire ce travail.

Merci beaucoup à Mme Corinne Leyval de m'avoir accueillie et acceptée dans son laboratoire et à Patrick d'avoir accepté ma candidature pour ce projet.

Je remercie également l'ADEME et le BRGM, qui ont financé ces trois années de thèse ainsi que Mme Cécile Grand, ce qui m'a permis de réaliser ce travail.

Je n'ai pas la réputation d'être très bavarde et démonstrative. C'est pour cette raison que ces remerciements cibleront l'essentiel. Tout d'abord, je tiens à dire un grand « Merci » à Ina pour son encadrement durant mes stages de Master 1 et Master 2, ses conseils scientifiques et surtout sa philosophie de la science et de la recherche qui m'ont aidée à ne pas perdre le cap durant ces dernières années. D'une manière générale, c'est grâce aux personnes que j'ai rencontrées au cours de cette expérience (Caroline, Sophie, Julie) que j'accorde une grande importance au côté humain dans un laboratoire, certains me le reprocheront bien évidemment... J'en arrive donc à remercier de tout cœur mes amis, au sein du laboratoire ou des laboratoires voisins ou ayant eu un lien avec ces locaux : la Grande Chiche, Fabien, Emma, Remy, Damien, Olivia, Thomas et bien sûr la Pépette (tu apparais ici bien évidemment)! Merci beaucoup à vous les copains car, sans vous, les semaines et surtout les vendredi soirs auraient été bien tristes et mon foie bien moins résistant... Merci aux choupinots (Hein Olivia ?)! Merci aux excursions vosgiennes en bivouac, sans eau ou à la découverte de l'auvergne toujours sans eau (Hein Olivier ?)! Merci aux Berthom et aux pastèques (Hein Fab ?), à cette découverte musicale qu'est Patrice (Hein Remy ?), aux danses désarticulées (Hein Thomas ?), aux vacances à Seignosse (Hein Damien ?), aux jupes pas pratiques en soirée (Hein Emma ?) à Michael Jackson et Queen (Hein Chéwie ?) et surtout à la Belgique et à la Pologne (Hein tout le monde ?). Evidemment, chaque rock-star possède son lot de détracteurs, détracteurs que je remercie sincèrement. Grâce à vous j'ai grandi et je sais quelle voie je souhaite emprunter.

Plus sérieusement, je tiens à remercier les techniciennes du laboratoire Christine et Jojo ; Christine pour sa gentillesse et son aide à un moment où j'aurais eu du mal à m'en sortir seule (étiquettes, filtrations, étiquettes, filtrations, des tubes, toujours plus de tubes... Hhhaaaaaaa !!!!!), et Jojo pour sa franchise et pour nous faire très souvent mourir de rire ! Merci à toi, Aurélie ! Je ne sais pas si tu liras ces remerciements, mais merci pour l'ensemble des choses que tu m'as apprises en Biologie Moléculaire ; les expériences auraient été beaucoup plus compliquées à analyser sans toi. Merci à Géraldine et Hervé pour les dosages d'arsenic même quand je prévenais à la dernière

minute... Merci à Corinne qui est, le plus souvent possible, disponible dès qu'on a besoin d'un conseil, d'un coup de pouce mais aussi d'une remise en place. Un grand Merci à Thierry aussi appelé « Thierry national » pour sa bonne humeur, son humour indétronable, ses paroles gentilles qui font beaucoup de bien. Alors, comment se porte le calendrier ? Et tu as vu, je ne soutiens pas au mois de juillet, pas pendant le tour de France ? ;-) Merci à Djihad pour nous donner la preuve que la gentillesse à l'état pur existe encore et à Sylvie Désobry pour sa douceur. Je suis heureuse d'avoir croisé le chemin de Romain (alors ce GR ? Pour bientôt ? ;-)), Florent (pause-café plus productive en ta présence et enrichissement de ma culture musicale) et Asfaw (arrivé trop tard au labo... Dommage !) Et bien sûr, une petite pensée à tous les membres du labo que je n'ai pas cités. Je suis reconnaissante envers toi, Catherine, du temps que tu m'as accordé et de ton aide précieuse. Je vous remercie toutes les deux, avec Mme Valérie Laperche pour avoir été là au moment des prélèvements sur le site d'Auzon, malgré ce froid polaire. Merci à Francis aussi pour ses conseils et sa gentillesse.

A partir de ce moment, la langue française a beau être riche, « les mots manquent aux émotions » comme l'a dit Victor Hugo. Je vais essayer de faire de mon mieux.

Merci à JP, Fabrice Lanummoc et Fab (et oui encore !) qui me soutiennent et me supportent (de plus ou moins loin) depuis longtemps maintenant et j'ai conscience que ce n'est pas simple.

La personne la mieux placée pour le savoir est toi, Maman ! ;-) Cette thèse est ton cadeau, cadeau pour t'être battue contre vents et marées pour me porter de tes petits bras jusque-là ! J'en profite pour te promettre de rester fidèle à ce que tu m'as appris. A cela, j'ajoute une tendre pensée à Tinou !

Encore, merci à vous deux, les voisins d'un temps, pour toute cette amitié. J'ai le sentiment que rien ne peut nous arriver quand on est tous les quatre, à part peut-être une cirrhose***...

Je terminerai ces remerciements larmoyants par exprimer toute ma reconnaissance à toi, La pépette, Cécile et pour moi Chévie, pour ton amitié, ton amour, ta patience, ton soutien... et toute la folie que tu as de souhaiter continuer ton chemin avec moi à tes côtés. Etrangement, cette thèse aurait pu être plus simple dans son ensemble (quoique...) mais tellement plus dure sur la fin et beaucoup moins riche. Donc : Merci ! Je vois le printemps maintenant et les pirates ne me font toujours pas peur ! ;-) Même quand ces pirates s'appellent Marius et Gabin !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART	
<i>PARTIE I: LES ELEMENTS EN TRACES METALLIQUES DANS LES SOLS</i>	<i>7</i>
I.1. INTRODUCTION ET DEFINITIONS.....	7
I.2. L'ARSENIC DANS L'ENVIRONNEMENT.....	7
I.2.1. Généralités sur l'arsenic.....	7
I.2.2. Sources d'arsenic.....	8
I.2.2.1. Sources naturelles.....	9
I.2.2.2. Sources anthropiques.....	9
I.2.3. Formes de l'arsenic dans les sols.....	10
I.2.3.1. Formes inorganiques.....	11
I.2.3.2. Formes organiques.....	12
I.2.3.3. Spéciation de l'arsenic dans les sols et influence des paramètres édaphiques.....	13
I.2.4. Toxicité de l'arsenic.....	15
I.3. ETM DANS L'ENVIRONNEMENT.....	17
I.3.1. Antimoine dans l'environnement.....	17
I.3.2. Cd, Zn et Pb dans l'environnement.....	18
<i>PARTIE II: MECANISMES DE RESISTANCE DES BACTERIES AUX ELEMENTS EN TRACES METALLIQUES.....</i>	<i>21</i>
II.1. INTERACTIONS MICRO-ORGANISMES - ETM.....	21
II.2. MECANISMES BACTERIENS DE RESISTANCE A L'ARSENIC ET A L'ANTIMOINE.....	22
II.2.1. Le système <i>ars</i>	22
II.2.1.1. Organisation génétique de l'opéron <i>ars</i>	22
II.2.1.2. Régulation de l'opéron <i>ars</i>	24
II.2.1.3. Les pompes d'efflux de l'arsénite <i>ArsB/ACR3p</i>	25
II.2.2. Les mécanismes de biotransformation de l'arsenic.....	26
II.2.2.1. Les arsénite-oxydases.....	26
II.2.2.2. Les arséniate-réductases.....	28
II.2.2.2.1. Arséniate-réductase cytoplasmique	
II.2.2.2.2. Arséniate-réductase respiratoire	
II.2.3. Phénomènes de biotransformation de l'arsenic dans les milieux naturels.....	31
II.3. MECANISMES DE RESISTANCE BACTERIENS AU Cd, Zn ET Pb.....	34
<i>PARTIE III: EVALUATION DE LA (BIO)DISPONIBILITE DES ETM DANS LES SOLS.....</i>	<i>39</i>
III.1. NOTIONS DE MOBILITE, BIOACCESSIBILITE ET BIODISPONIBILITE D'UN POLLUANT METALLIQUE.....	39
III.1.1. Evaluation chimique de la (bio)disponibilité.....	40
III.1.1.1. Détermination des teneurs totales.....	40
III.1.1.2. Spéciation des ETM.....	41
III.1.1.3. Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des ETM.....	43
III.1.2. Evaluation biologique : les « bioindicateurs »	44
III.1.2.1. Définitions.....	44
III.1.2.2. Applications aux ETM.....	46
III.2. EXPRESSION DE GENES FONCTIONNELS BACTERIENS DANS LES SOLS.....	47
III.2.1. Extraction des ARN du sol.....	47

III.2.2. Précédentes études de l'expression des gènes dans des systèmes complexes..	49
III.2.3. Etudes métatranscriptomiques <i>in situ</i>	51

PARTIE IV: OBJECTIFS DE LA THESE.....	53
--	-----------

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. SITES D'ETUDE.....	57
I.1. Site d'Auzon (parcelle 227).....	57
I.1.1. Caractéristiques du site.....	57
I.1.2. Echantillonnage, préparation et caractéristiques des échantillons de sols.....	58
I.2. Terres de Neuves-Maisons.....	59
I.2.1. Origine et caractéristiques physico-chimiques des terres.....	59
I.2.2. Parcelles lysimétriques.....	60
I.2.3. Echantillonnage et préparation des échantillons de terres.....	62
II. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX.....	63
II.1. Culture en milieu liquide.....	63
II.1.1. Extraction des bactéries du sol par gradient de densité (Courtois <i>et al.</i> , 2001).....	63
II.1.2. Cultures d'enrichissement en présence d'arsenic.....	64
II.1.2.1. Dans un milieu nutritif.....	64
II.1.2.2. Dans un milieu minimum.....	64
II.2. Incubations dans du sable stérile.....	64
II.3. Microcosmes de sols.....	65
II.3.1. Sans source de carbone.....	65
II.3.2. Avec source de carbone.....	65
III. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES ECHANTILLONS DE SOLS.....	66
III.1. Détermination de l'humidité résiduelle.....	66
III.2. Détermination du pourcentage de matière organique.....	66
III.3. Analyse de l'arsenic total dans les échantillons de sol.....	66
III.4. Mesure du pH.....	67
III.5. Dosage du glucose.....	67
III.6. Extraction de l'arsenic disponible.....	67
III.6.1. Extraction à l'eau (Norme NFX 31-210).....	67
III.6.2. Extraction au phosphate de potassium (Alam <i>et al.</i> , 2001).....	67
III.7. ICP et chromatographie ionique.....	68
IV. ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	69
IV.1. REPERTOIRE DES BACTERIES ET DES PLASMIDES.....	69
IV.2. EXTRACTION DES ADN GENOMIQUES.....	70
IV.3. EXTRACTION DES ARN TOTAUX A PARTIR D'ECHANTILLONS DE SOLS.....	70
IV.3.1. Première méthode d'extraction.....	70
IV.3.2. Seconde méthode d'extraction (Monard <i>et al.</i> , 2010).....	70
IV.3.2.1. Equilibrage du phénol.....	70
IV.3.2.2. Extraction des ARN totaux.....	71
IV.4. PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES.....	71
IV.4.1. Purification des ARN.....	71
IV.4.2. Purification des ADN.....	72
IV.5. TRANSCRIPTION INVERSE.....	72
IV.6. AMPLIFICATION PAR PCR.....	72
IV.7. QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL.....	74
IV.7.1. Principe.....	74
IV.7.2. Préparation des gammes standards.....	75

IV.7.3. Mélange réactionnel et conditions d'amplification.....	76
IV.8. CLONAGE ET SEQUENÇAGE.....	77
IV.8.1. Purification des produits PCR et ligation plasmidique.....	77
IV.8.2. Transformation d' <i>E.coli</i>	78
IV.8.3. Criblage des transformants et séquençage.....	78
IV.9. ALIGNEMENT DES SEQUENCES.....	78
IV.10. CONCEPTION DES AMORCES OLIGONUCLEOTIDIQUES.....	79
IV.11. ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE.....	80
IV.11.1. PCR-TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis.....	80
IV.11.1.1. Conditions de PCR.....	80
IV.11.1.2. Préparation et condition de migration des gels TTGE.....	80
IV.11.2. PCR-CE-SSCP.....	81
IV.11.2.1. Conditions de PCR.....	81
IV.11.2.2. Protocole expérimental.....	82
V. ANALYSES STATISTIQUES.....	82

CHAPITRE III : RESULTATS

<i>PARTIE I: MISE AU POINT DE LA QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL DES GENES <i>arsB</i>, <i>ACR3</i> ET <i>aioA</i> ET DE LEURS TRANSCRITS.....</i>	87
I.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	87
I.2. CHOIX DES AMORCES ET PREPARATION DES PLASMIDES STANDARDS POUR LA PCR EN TEMPS REEL.....	88
I.3. RESULTATS.....	89
I.3.1. Optimisation des conditions d'amplification par PCR en temps réel.....	89
I.3.2. Validation des conditions de quantification.....	93
I.3.2.1. Démarche expérimentale.....	93
I.3.2.2. Evolution de la densité optique au cours du temps.....	94
I.3.2.3. Etude semi-quantitative de l'expression des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	94
I.3.2.4. RT-PCR en temps réel.....	95
I.4. DISCUSSION.....	97
<i>PARTIE II: OUTILS D'ETUDE DE LA REPONSE ADAPTATIVE D'UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE AU Cd, Zn ET Pb.....</i>	99
II.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	99
II.2. CONCEPTION D'AMORCES OLIGONUCLEOTIDIQUES CIBLANT LES ATPases DE TYPE P_{IB}	100
II.3. RESULTATS.....	101
II.3.1. Evaluation de la spécificité des amorces.....	101
II.3.2. Vérification de la spécificité des amorces sur une banque d'ADN métagénomique.....	103
II.3.2.1. Clonage-séquençage de l'amplicon.....	103
II.3.2.2. Arbre phylogénétique des ATPases de type P_{IB}	106
II.3.3. Diversité des ATPases de type P_{IB} dans deux sols pollués.....	108
II.4. DISCUSSION.....	111
<i>PARTIE III: DYNAMIQUE D'EXPRESSION DES GENES <i>arsB</i>, <i>ACR3</i> ET <i>aioA</i> DANS UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE TELLURIQUE EXPOSEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN ARSENIC.....</i>	113
III.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	113
III.2. DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	114

III.3. RESULTATS.....	115
III.3.1. Suivi des paramètres des cultures.....	115
III.3.1.1. Evolution de la densité optique au cours du temps.....	115
III.3.1.2. Evolution du pH.....	115
III.3.1.3. Consommation du glucose.....	116
III.3.1.4. Oxydation de l'arsénite.....	117
III.3.2. Abondance des gènes codant les transporteurs d'As(III) et les As(III)-oxydases.....	118
III.3.2.1. Abondance relative des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	118
III.3.2.2. Abondance relative du gène <i>aioA</i>	121
III.3.3. Corrélations entre l'abondance relative des gènes et les concentrations en arsenic total.....	121
III.3.4. Dynamique d'expression des gènes de résistance.....	123
III.3.4.1. Expression des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	123
III.3.4.2. Expression du gène <i>aioA</i>	124
III.3.5. Etude de la diversité bactérienne dans les cultures en présence d'arsenic.....	125
III.3.5.1. Analyse par CE-SSCP.....	125
III.3.5.2. Analyse par PCR-TTGE.....	126
III.3.5.3. Clonage-séquençage.....	127
III.4. DISCUSSION.....	130
III.4.1. Paramètres physico-chimiques des cultures.....	130
III.4.2. Choix de l'analyse statistique.....	131
III.4.3. Corrélation entre l'abondance relative des gènes cibles et concentration en arsenic total.....	131
III.4.4. Cinétique d'expression et diversité des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	132
III.4.5. Cinétique d'expression du gène <i>aioA</i> et oxydation de l'As(III) en As(V).....	133
III.4.6. Diversité bactérienne.....	135
 PARTIE IV : ETUDE EN BATCH DE L'IMPACT DE L'ARSENITE ET DE L'ARSENIATE SUR LA REPONSE TRANSCRIPTIONNELLE D'UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE.....	 137
IV.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	138
IV.2. DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	138
IV.3. RESULTATS.....	139
IV.3.1. Suivi des paramètres des microcosmes.....	139
IV.3.1.1. Activité microbienne.....	139
IV.3.1.2. Biotransformation de l'arsenic dans les microcosmes.....	140
IV.3.2. Abondance et expression des gènes codant les transporteurs d'As(III) et les As(III)-oxydases dans les batchs.....	141
IV.3.3. Etude de la diversité bactérienne dans les batchs.....	142
IV.4. DISCUSSION.....	145
IV.4.1. Abondance relative des gènes étudiés.....	145
IV.4.2. Expression relative des gènes étudiés.....	146
IV.4.3. Devenir de l'As(III) et de l'As(V) dans les microcosmes de sable.....	147
IV.4.4. Etude de la diversité bactérienne.....	148
 PARTIE V : DYNAMIQUE DE L'ABONDANCE <i>in situ</i> DES GENES <i>arsB</i>, <i>ACR3</i> ET <i>aioA</i> DANS UNE TERRE MULTICONTAMINEE.....	 151
V.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	151
V.2. DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	152

V.3. RESULTATS.....	153
V.3.1. Abondance relative des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i> dans les parcelles expérimentales au cours du temps et en fonction des traitements.....	153
V.3.1.1. Impact du temps et de la végétation sur l'abondance relative des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	154
V.3.1.2. Impact de la thermo-désorption sur l'abondance relative des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	154
V.3.2. Abondance relative du gène <i>aioA</i> dans les parcelles expérimentales au cours du temps et en fonction des traitements.....	156
V.3.3. Quantification de l'arsenic total, mobile et/ou disponible dans les terres des parcelles lysimétriques.....	158
V.3.3.1. Arsenic total.....	158
V.3.3.2. Fractions d'arsenic mobile et disponible dans les parcelles lysimétriques.....	159
V.3.4. Corrélations entre les abondances relatives des gènes et les différents paramètres physico-chimiques des parcelles lysimétriques.....	160
V.4. DISCUSSION.....	163
V.4.1. Impact de la végétation sur l'abondance relative des gènes.....	164
V.4.2. Corrélation entre l'abondance relative des gènes, l'arsenic total et échangeable dans les parcelles et le phosphore assimilable.....	166

PARTIE VI : ABONDANCE DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* DANS LES MICROCOSMES DE SOL EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ARSENIC.....

VI.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	169
VI.2. ABONDANCE DES GENES <i>arsB</i>, <i>ACR3</i> ET <i>aioA</i> DANS DES MICROCOSMES DE SOLS COUVRANT UNE LARGE GAMME DE CONCENTRATIONS EN ARSENIC.....	170
VI.2.1. Démarche expérimentale.....	170
VI.2.2. Résultats.....	171
VI.2.2.1. Fractions d'arsenic disponible dans les échantillons de sol d'Auzon.....	171
VI.2.2.2. Quantification des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> , <i>aioA</i> et codant l'ARNr 16S dans les sols.....	172
VI.2.2.3. Comparaison de 2 protocoles d'extraction des ARN.....	173
VI.3. ABONDANCE DES GENES <i>arsB</i>, <i>ACR3</i> ET <i>aioA</i> DANS DES MICROCOSMES DE SOLS STIMULES PAR L'AJOUT DE CITRATE.....	175
VI.3.1. Démarche expérimentale.....	175
VI.3.2. Résultats.....	177
VI.3.2.1. Evolution de la (bio)disponibilité de l'arsenic et l'antimoine.....	177
VI.3.2.2. Activité microbienne dans les microcosmes de sols.....	182
VI.3.2.3. Quantification de la communauté bactérienne totale.....	182
VI.3.2.4. Proportion de bactéries résistantes à l'arsenic.....	185
VI.3.2.4.1. Quantification des gènes codant les pompes d'efflux de l'arsénite	
VI.3.2.4.2. Quantification des gènes codant l'arsénite-oxydase	
VI.3.2.4.3. Corrélations entre l'abondance relative des gènes et l'arsenic (bio)disponible	
VI.4. DISCUSSION.....	190
VI.4.1. Arsenic et antimoine mobiles et disponibles vs teneurs totales respectives dans les microcosmes de sol.....	190
VI.4.2. Bactéries présentes dans les microcosmes de sols.....	191
VI.4.2.1. La communauté bactérienne totale.....	191
VI.4.2.2. La communauté bactérienne résistante à l'arsenic.....	192
VI.4.3. Concentrations d'arsenic et d'antimoine mobiles et échangeables et	

abondance relative de l'ADNr 16S et des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i>	193
VI.4.4. (Bio)disponibilité des ETM vs communautés bactériennes dans ces microcosmes.....	194
<i>VI.4.4.1. Evaluation de la (bio)disponibilité.....</i>	<i>194</i>
<i>VI.4.4.2. Lien(s) entre les communautés bactériennes de ces sols et la (bio)disponibilité de l'arsenic et de l'antimoine.....</i>	<i>195</i>

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE.....	199
PERSPECTIVES.....	205

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	213
ANNEXES.....	237

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ACR : Arsenical compound resistance

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Aio : Arsénite oxydase

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

Arr : Arséniate-réductase respiratoire

Ars : Arsenical resistance system

As(III) : Arsénite

As(V) : Arséniate

BSA : Bovine Serum Albumin

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Cd : Cadmium

CE-SSCP : Capillary Electrophoresis – Single Strand Conformation Polymorphism

CoDeHOP : Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers

Ct : Threshod Cycle

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

dNTP : désoxyribonucléotide

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétate

Eh : Potentiel redox

ET : Élément en traces

ETM : Élément en traces métalliques

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

Hg : Mercure

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des risques

LB : Lysogeny Broth (Luria Bertani)

MOD : Matière organique dissoute

MS : Matière sèche

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORF : Open Reading Frame

pb : paire de bases

Pb : Plomb

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pit : Phosphate inorganic transport

Pst : Phosphate specific transport

Rb : Rubidium

RT : Reverse Transcription

Sb : Antimoine

Sb(III) : Antimonite

Sb(V) : Antimoniate

Sr : Strontium

TTGE : Temporal Temperature Gel Electrophoresis

Zn : Zinc

Zr : Zirconium

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Cycle de l'arsenic dans l'environnement.....	9
Figure 2 :	Diagramme Eh-pH-pe des espèces aqueuses de l'arsenic à 25°C et 1 bar de pression (adapté de Smedley et Kinniburgh, 2002).....	11
Figure 3 :	Mécanismes de biotransformation de l'arsenic inorganique (adapté de Bentley et Chasteen, 2002 ; Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2002 et Le <i>et al.</i> , 2000).....	12
Figure 4 :	Diagramme Eh-pH des espèces aqueuses du Cd (a), Pb (b) et Zn (c) à 25°C et 1 bar de pression (Takeno, 2005).....	20
Figure 5 :	Synthèse des processus bactériens intervenant dans la spéciation, le piégeage ou l'accumulation des ETM (adapté de Bertrand <i>et al.</i> , 2011).....	22
Figure 6 :	Organisation génétique des 2 opérons <i>ars1</i> et <i>ars2</i> chez la souche <i>Ochrobactrum tritici</i> SCII24 (Branco <i>et al.</i> , 2008).....	24
Figure 7 :	Localisation cellulaire et fonction du système d'oxydation de l'As(III) (A gauche, d'après Silver et Phung, 2005). Modèle de l'As(III)-oxydase d' <i>Alcaligenes faecalis</i> (A droite, d'après Silver et Phung, 2005).....	27
Figure 8 :	Localisation cellulaire et fonction des composants du système <i>ars</i> (d'après Silver et Phung, 2005).	29
Figure 9 :	Localisation cellulaire et fonction du système de respiration de l'As(III) (A gauche, d'après Silver et Phung, 2005). Modèle de l'As(V)-réductase respiratoire de <i>Chrysiogenes arsenatis</i> (A droite, d'après Silver et Phung 2005).....	30
Figure 10 :	Diversité phylogénétique des Bactéries et Archae métabolisant l'arsenic (Stolz <i>et al.</i> , 2010)	31
Figure 11 :	Diversité phylogénétique des procaryotes métabolisant l'arsenic (Oremland et Stolz, 2003).....	32
Figure 12 :	Arbre phylogénétique des ATPases de type P (adapté de Axelsen et Palmgren, 1998) avec leurs différentes fonctions.....	35
Figure 13 :	Arbre phylogénétique des ATPases de type P _{IB} (Argüello <i>et al.</i> , 2007).....	36
Figure 14 :	Mécanismes de l'homéostasie du zinc chez les bactéries à Gram-négatif (Rensing et Mitra, 2007).....	37
Figure 15 :	Principaux domaines structuraux d'une ATPase de type P _{IB-2}	38
Figure 16 :	Fractions biodisponible et bioaccessible d'un contaminant dans le sol définies par sa localisation (Semple <i>et al.</i> , 2004).....	40
Figure 17 :	Différentes formes et localisations des ETM dans les sols (adapté de Tecon et van der Meer, 2008).....	42
Figure 18 :	Concept d'une cellule bactérienne « biosenseur » (adapté de Tecon et van der Meer, 2008).....	46
Figure 19 :	Représentation cartographique, avec une maille de 10 mètres, des concentrations en arsenic (mg As/kg sol sec) pour des prélèvements en surface de 0 à -20 cm.....	56
Figure 20 :	Photo de la station expérimentale à Homécourt (Meurthe-et-Moselle, France).....	61
Figure 21 :	Schéma des parcelles lysimétriques.....	62
Figure 22 :	Fixation du SYBR Green I à l'ADN double brin.....	74
Figure 23 :	Stratégies de clonage des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i> dans le plasmide pCR2.1.....	89
Figure 24 :	Courbes de calibration des gènes <i>arsB</i> (noir), <i>ACR3</i> (gris) et <i>aioA</i> (pointillés) issues des amplifications par PCR en temps réel.....	90
Figure 25 :	Amplification par PCR en temps réel des dilutions décimales des plasmides pCR2.1- <i>arsB</i> (en haut à gauche), pCR2.1- <i>ACR3</i> (en haut à droite) et pCR2.1- <i>aioA</i> (en bas à gauche).....	90
Figure 26 :	Courbes de fusion obtenues à partir de la quantification par PCR en temps réel d'une dilution décimale des plasmides PCR2.1- <i>arsB</i> (A), PCR2.1- <i>ACR3</i> (B) et PCR2.1- <i>aioA</i> (C).....	92

Figure 27 :	Démarche expérimentale mise en place pour étudier la réponse d'une communauté bactérienne à l'As(III) et/ou à l'As(V).....	93
Figure 28 :	Croissance des cultures bactériennes en présence d'As(III), d'As(V) et des 2 formes d'arsenic.....	94
Figure 29 :	Amplifications des ADNc <i>arsB</i> (A) et <i>ACR3</i> (B) extraits des cultures en présence des différentes concentrations en As(III) et en As(V).....	95
Figure 30 :	Quantification de l'expression relative des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> dans les différents batches au bout de 2 jours d'incubation.....	96
Figure 31 :	Principaux domaines structuraux d'une ATPase de type P _i spécifique des ETM (Chan <i>et al.</i> , 2010).....	100
Figure 32 :	Représentation « Logo » des vingt séquences d'ATPases de type P _i spécifiques des ETM sélectionnées (créée à l'aide du programme weblogo.....	101
Figure 33 :	Résultats de la PCR ciblant les gènes codant les ATPases de type P _i avec les amorces CadD1For et CadL5-Rev.....	102
Figure 34 :	Résultats de la PCR ciblant les gènes codant pour les ATPases de type P _i avec les amorces ATPaseD3-For et ATPaseL4-Rev.....	103
Figure 35 :	Résultats de la PCR ciblant les gènes codant pour les ATPases de type P _i	104
Figure 36 :	Diversité des ATPases de type P _i dans la banque métagénomique HAR8. (Arbre phylogénétique Neighbor-Joining enraciné construit avec le logiciel Mega 4.0).....	107
Figure 37 :	Diversité des ATPases de type P _i dans l'ADN extrait des sols NM-MS au temps T11 et du sol 9 d'Auzon.....	110
Figure 38 :	Démarche expérimentale mise en place pour étudier la réponse d'une communauté bactérienne à l'As(III).....	114
Figure 39 :	Croissance des cultures bactériennes en présence de différentes concentrations en As(III) (0, 10 µM, 100 µM, 1 mM et 10 mM) pendant 7 j d'incubation.....	115
Figure 40 :	Evolution du pH dans les cultures-batch.....	116
Figure 41 :	Evolution de la concentration en glucose dans les cultures-batch.....	117
Figure 42 :	Evolution de la concentration en As(V) dans les cultures-batch.....	118
Figure 43 :	Abondance relative du gène <i>arsB</i> dans les cultures au cours du temps.....	119
Figure 44 :	Abondance relative du gène <i>ACR3</i> dans les cultures au cours du temps.....	119
Figure 45 :	Abondance relative des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i> après sept jours d'incubation en présence de 10 mM d'As(III).....	120
Figure 46 :	Abondance relative du gène <i>aioA</i> dans les cultures au cours du temps.....	121
Figure 47 :	Expression relative des gènes <i>arsB</i> (histogramme du haut) et <i>ACR3</i> (histogramme du bas) dans les cultures au cours du temps.....	124
Figure 48 :	Expression relative du gène <i>aioA</i> dans les cultures au cours du temps.....	125
Figure 49 :	Profils CE-SSCP des produits PCR de l'ADNr 16S (région V3) issus de l'ADN bactérien de l'inoculum initial (A) et des cultures après 2 j, 3 j, 5 j et 7 j en absence d'As(III) et en présence de 10 µM, 100 µM, 1 mM et 10 mM d'As(III) (B).....	126
Figure 50 :	Profils TTGE de l'ADNr 16S et de l'ARNr 16S des cultures.....	127
Figure 51 :	Démarche expérimentale pour l'étude de la réponse d'une communauté bactérienne à un mélange d'As(III) et d'As(V).....	139
Figure 52 :	Evolution de la minéralisation du carbone, correspondant à la production de CO ₂ , au cours des incubations des microcosmes.....	140
Figure 53 :	Profils TTGE des ADNr 16S obtenus à partir de la communauté incubée pendant 6 jours en présence d'ERA et d'ERA+As.....	143
Figure 54 :	Démarche expérimentale pour l'étude <i>in situ</i> et à long terme de l'abondance des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i> dans un sol multi-contaminé.....	153

Figure 55 :	Nombre de copies de gène <i>arsB</i> rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10).....	155
Figure 56 :	Nombre de copies de gène <i>ACR3</i> rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10).....	156
Figure 57 :	Nombre de copies de gène <i>aioA</i> rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10).....	157
Figure 58 :	Evolution de la concentration d'arsenic dans la terre des parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10) (Analyses INRA Arras, données GISFI).....	158
Figure 59 :	Evolution de la biomasse (luzerne) dans les parcelles NM-MSm et TD-MSm de 2006 à 2010.....	161
Figure 60 :	Evolution des concentrations de phosphore assimilable (P_2O_5) dans les parcelles NM-VS, NM-TN, NM-MSm et TD-MSm de 2005 à 2010 (Données du GISFI).....	162
Figure 61 :	Microcosmes des sols d'Auzon 4, 6, 9 et 10 pour l'étude de la réponse d'une communauté bactérienne à l'arsenic après un ajout d'eau et une incubation à 24°C pendant 2 jours.....	171
Figure 62 :	Nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S par gramme de sol dans les sols 4, 6, 9 et 10 après deux jours d'incubation.....	172
Figure 63 :	Nombre de copies des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> (histogramme du haut) et <i>aioA</i> (histogramme du bas) rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les incubations des sols 4, 6, 9 et 10, au temps initial T0 et après deux jours d'incubation.....	173
Figure 64 :	Nombre de copies d'ARNr 16S (extraits en suivant le protocole de Monard <i>et al.</i> , 2011 et le protocole du kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » (MP Biomedicals)) par gramme de sol après deux jours d'incubation des sols 4, 6, 9 et 10.....	174
Figure 65 :	Microcosmes des sols d'Auzon 2 et 9 pollués à l'arsenic pour l'étude de la réponse d'une communauté bactérienne à l'arsenic avec ou sans stimulation par ajout de citrate et de nitrate d'ammonium.....	177
Figure 66 :	Evolution au cours du temps des fractions d'arsenic (graphiques A et B) et d'antimoine (graphiques C et D) extractibles à l'eau dans les microcosmes des sols 2 et 9, stimulés et non stimulés.....	179
Figure 67 :	Evolution au cours du temps des fractions d'arsenic (graphiques A et B) et d'antimoine (graphiques C et D) échangeables au phosphate de potassium dans les microcosmes des sols 2 et 9, stimulés et non stimulés.....	181
Figure 68 :	Evolution de la minéralisation du carbone, correspondant à la production de CO_2 , au cours des incubations des microcosmes de sols d'Auzon « Sol 2-S », « Sol 2-NS », « Sol 9-S » et « Sol 9-NS ».....	182
Figure 69 :	Abondance relative du gène ADNr 16S dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.....	184

Figure 70 :	Abondance relative du gène <i>arsB</i> dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.....	186
Figure 71 :	Abondance relative du gène <i>ACR3</i> dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.....	187
Figure 72 :	Abondance relative du gène <i>aioA</i> dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.....	189
Figure 73 :	Bilan de la réponse des bactéries du sol à l'arsenic et à l'antimoine à travers l'étude de l'abondance et de l'expression relatives des gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i>	203

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Origines du Cd, Pb et Zn dans les sols (Baize, 1997 ; Deneux-Mustin <i>et al.</i> , 2003).....	19
Tableau 2 :	Concentrations en ETM totaux dosées par le NITON sur les échantillons de sol tamisés 2, 4, 6, 9 et 10.....	59
Tableau 3 :	Caractéristiques des sols NM-MSm et TD-MSm aux prélèvements T0 (sept. 2005) et T9 (mai 2010).....	60
Tableau 4 :	Souches bactériennes et plasmides.....	69
Tableau 5 :	Composition de mélange pour l'extraction des ARN totaux de sol.....	71
Tableau 6 :	Caractéristiques des oligonucléotides utilisés pour cette étude.....	73
Tableau 7 :	Programme PCR pour les gènes <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i>	73
Tableau 8 :	Mélange réactionnel utilisé en PCR en temps réel.....	77
Tableau 9 :	Programme utilisé en PCR en temps réel.....	77
Tableau 10 :	Bactéries références et numéro d'accension des séquences protéiques.....	79
Tableau 11 :	Caractéristiques des oligonucléotides testés dans cette étude sur les ATPases de type P_1	80
Tableau 12 :	Mélange réactionnel utilisé en PCR CE-SSCP.....	81
Tableau 13 :	Programme utilisé en PCR CE-SSCP.....	81
Tableau 14 :	Facteurs d'induction de l'expression relative (ARNm / ARNr 16S) des gènes <i>arsB</i> et <i>ACR3</i> pour chaque condition de l'expérience au bout de 2 jours d'incubation.....	96
Tableau 15 :	Diversité des séquences (Blastx) amplifiées par PCR à partir de l'ADN métagénomique HAR8.....	105
Tableau 16 :	Diversité des séquences (Blastx) amplifiées par PCR à partir de l'ADN du sol NM au temps T11 (CAD...-MS-T11) et du sol 9 d'Auzon (CAD...-Sol9).....	109
Tableau 17 :	Test de corrélation de Pearson entre l'abondance relative des gènes bactériens et la concentration en arsenic pour les prélèvements réalisés au bout de 2 j, 3 j, 5 j et 7 j d'incubation.....	122
Tableau 18 :	Résultats « blastn » du séquençage de l'ADNc 16S, <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i> pour les conditions sans As(III), 1 mM et 10 mM d'As(III) après 5 j d'incubation.....	129
Tableau 19 :	Evolution de la concentration en arsenic total (dosée par ICP) et en As(V) (dosée par chromatographie ionique) dans les batchs.....	141
Tableau 20 :	Quantification par PCR en temps réel des gènes ADNr 16S, <i>arsB</i> , <i>ACR3</i> et <i>aioA</i> et de leurs transcrits respectifs dans les batchs contenant des exsudats seuls et des exsudats + arsenic après six jours.....	142
Tableau 21 :	Identification des bactéries dans les microcosmes au bout de 6 jours d'incubation par le séquençage des bandes TTGE présentes dans la figure 53 et l'isolement de souches bactériennes.....	144
Tableau 22 :	Résultats « blastx » du séquençage de l'ADN <i>ACR3</i> pour les conditions ERA et ERA + arsenic après 6 jours d'incubation des batchs.....	145
Tableau 23 :	Quantités d'arsenic extrait au phosphate de potassium dans les parcelles NM-TN(10), NM-VS(3), NM-MSm(14) et TD-MSm(13) de 2005 à 2010.....	159
Tableau 24 :	Test de corrélation de Pearson entre l'abondance relative des gènes bactériens et les différents paramètres mesurés dans les parcelles lysimétriques.....	163
Tableau 25 :	Paramètres physico-chimiques et teneurs en arsenic des sols 2, 4, 6, 9 et 10 utilisés dans cette étude.....	172
Tableau 26 :	Concentration en ARN et ratio 260/280 obtenus après extraction des ARN des incubations de sols 4, 6, 9 et 10 pendant 48 h en suivant les protocoles de Monard <i>et al.</i> , 2011 et du kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » (MP Biomedicals).....	175
Tableau 27 :	Test de corrélation de Pearson entre l'abondance relative des gènes bactériens et les concentrations en arsenic et en antimoine extractibles à l'eau et échangeables au phosphate de potassium.....	190

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

L'homme a profondément modifié, surtout depuis le début de l'âge industriel, les différents biotopes de la planète, par exemple, par la synthèse de substances artificielles telles que les xénobiotiques dans l'agriculture (herbicides, fongicides etc.) ou l'industrie (PolyChloroBiphényles, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques), ou par l'utilisation intensive de composés naturels toxiques comme les métaux (cuivre, mercure etc.). Tous ces composés se retrouvent dans les sols, les sédiments, les cours d'eau, où ils modifient les activités microbiennes et se retrouvent dans la chaîne alimentaire causant de nombreux problèmes ; les conséquences délétères de la pollution sur la santé humaine et, de façon plus générale, sur l'ensemble de la biosphère sont devenues les causes d'une préoccupation majeure de nos sociétés modernes.

Les micro-organismes sont des acteurs majeurs dans les processus d'élimination naturelle des polluants et ont développé de nombreuses résistances aux éléments en traces métalliques (ETM). Parmi les mécanismes de résistance décrits sont présents les transporteurs spécifiques à un métal ou à spectre large, des oxydases ou des réductases qui transforment le métal en un composé volatil ou un composé moins toxique ou encore des structures extracellulaires permettant d'immobiliser le composé toxique.

Les cellules bactériennes, par leur petite taille et leur capacité à modifier leur forme, leur bagage enzymatique et le métabolisme associé à leurs enveloppes, sont en perpétuelle interaction avec leur environnement. L'étude de l'adaptation des micro-organismes aux différents biotopes constitue donc un domaine fascinant de la microbiologie et de l'écologie microbienne, dès lors que les processus adaptatifs peuvent être corrélés à la biodisponibilité des polluants dans les différents écosystèmes.

Ce travail de thèse a particulièrement ciblé l'abondance et la dynamique transcriptionnelle des gènes codant des pompes membranaires d'efflux des ETM (arsenic, cadmium, plomb et zinc) mais également des arsénite-oxydases ayant pour fonction de transformer l'arsenic en une forme inorganique moins toxique pour les bactéries. Les approches développées dans la thèse avaient pour objectif d'étudier les relations entre la réponse de ces microorganismes à la présence de métaux et métalloïdes, par l'intermédiaire des gènes fonctionnels impliqués et la biodisponibilité de ces polluants métalliques dans les sols.

Le premier chapitre du présent manuscrit propose donc un état de l'art des travaux scientifiques concernant les ETM dans les sols, les mécanismes bactériens de résistance à ces ETM ainsi que la notion de biodisponibilité dans ces matrices environnementales et les différentes approches mises en œuvre pour l'appréhender.

Le second chapitre présente les matériels et méthodes utilisés au cours du présent travail. Le troisième chapitre fait état des résultats obtenus et est articulé en six parties montrant les résultats ainsi que leur discussion pour chacune des approches expérimentales.

Enfin le quatrième chapitre est une discussion générale autour de l'ensemble de ce travail de thèse mais aussi une proposition des différentes perspectives qu'il serait pertinent de développer dans le futur.

CHAPITRE I

ETAT DE L'ART

PARTIE I : LES ELEMENTS EN TRACES METALLIQUES DANS LES SOLS

I.1. INTRODUCTION ET DEFINITIONS

➤ Les sols sont issus de matériaux appartenant à la croûte continentale supérieure et les estimations récentes de sa composition permettent d'établir une liste des éléments majeurs et des éléments en traces (Sterckeman, 2004). Les **éléments en traces** (ET) sont les 80 éléments chimiques, constituants de la croûte continentale supérieure, dont la concentration est pour chacun d'entre eux inférieure à 1000 mg.kg^{-1} . Ils représentent à eux tous moins de 1% de la masse de la croûte continentale supérieure alors que les 11 éléments majeurs (H, O, Si, Al, Ti, Na, Ca, Fe, Mg, P et K) représentent plus de 99% de cette masse (Girard *et al.* 2005).

➤ Dans les sols, les ET sont soit des métaux, des métalloïdes ou des non-métaux. Le terme d'ETM, **éléments en traces métalliques**, désigne donc les métaux et métalloïdes réputés toxiques et dont la teneur moyenne dans les sols est inférieure à 1000 mg.kg^{-1} . Ils sont tous potentiellement polluants. Cela dépend de leur concentration dans le milieu considéré (sol, air, eau, sédiment) mais surtout de leur forme chimique c'est-à-dire leur spéciation (Bourrelrier et Berthelin, 1998).

Ces ETM sont étroitement liés à la civilisation. En effet, l'or, l'argent et le cuivre ont permis de fabriquer les premières pièces de monnaie et sans les ETM, il n'y aurait eu ni peintures, ni vitraux, ni miroirs ni même distribution d'eau potable à Rome par les canalisations en plomb pour remplacer celles en bois. Ces ETM ont été ainsi fortement utilisés et sont encore utilisés par l'Homme, mais cette utilisation a conduit à des concentrations significatives dans l'environnement et à des phénomènes de toxicité.

I.2. L'ARSENIC DANS L'ENVIRONNEMENT

I.2.1. GENERALITES SUR L'ARSENIC

L'arsenic, élément chimique de symbole As, de numéro atomique 33 et de masse molaire atomique égale à $74,9 \text{ g.mol}^{-1}$, est le trente-troisième élément de la classification périodique (Annexe 1). C'est un analogue chimique du phosphore et ses propriétés physiques et

chimiques sont intermédiaires entre celles des métaux et des non-métaux. Il appartient donc au groupe des métalloïdes.

Découvert vers 1250 par Albertus Magnus, il a été au centre de nombreuses controverses dans l'histoire humaine, ce qui a fait rimer ce métalloïde avec le mot « poison ». En effet, il est malheureusement réputé pour avoir causé la mort de personnes telles que Napoléon et le président américain Zachary Taylor. De plus, les composés arséniés organiques ont été les premiers agents antimicrobiens spécifiquement synthétisés pour le traitement des maladies infectieuses. L'exemple le plus connu concerne Paul Ehrlich, qui a obtenu le Prix Nobel de médecine en 1908 pour le composé « Salvarsan », dérivé de l'arsenic, très actif pour soigner la syphilis (Blondeau A, 1992).

I.2.2. SOURCES D'ARSENIC

L'arsenic est un élément ubiquitaire se classant à la 20^{ème} place en termes d'abondance dans la croûte terrestre, à la 14^{ème} place dans l'eau de mer et à la 12^{ème} place dans le corps humain (Woolson, 1975).

La teneur moyenne en arsenic terrestre est de 1,5 à 3 mg.kg⁻¹ (Mandal et Suzuki, 2002) et cette teneur moyenne est estimée à 2 mg.kg⁻¹ dans la partie superficielle de la croûte terrestre (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Localement, le fond géochimique peut atteindre des valeurs beaucoup plus élevées (200 mg.kg⁻¹ dans des dépôts calcaires, phosphatés ou dans les schistes). Les sources d'arsenic présent dans l'environnement sont aussi bien naturelles qu'anthropiques. Les sources de l'arsenic et son cycle dans l'environnement sont schématisés présenté dans la figure 1 et décrits dans les deux paragraphes suivants.

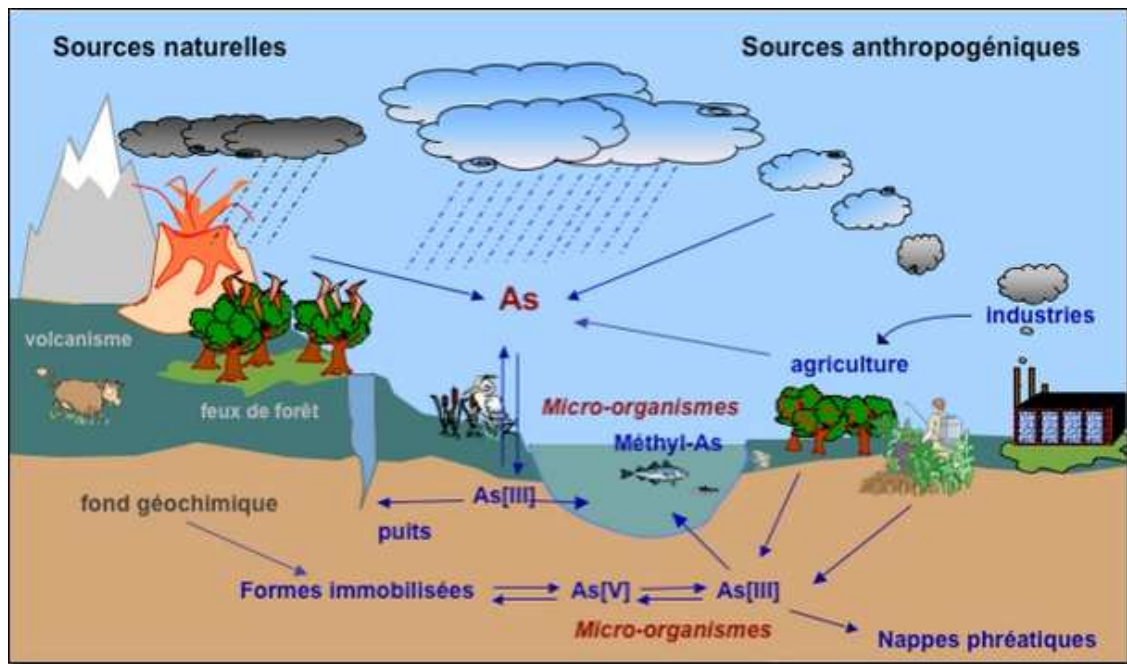


Figure 1 : Cycle de l'arsenic dans l'environnement

Source : <http://coursenligne.u-strasbg.fr/>

I.2.2.1. Sources naturelles

Le réservoir principal d'arsenic est constitué par les roches ignées et sédimentaires, renfermant plus de 99% de l'arsenic présent dans la croûte terrestre principalement sous forme d'arsénopyrite (FeAsS) et secondairement sous forme de sulfures tels que le réalgar (As_4S_4) aussi appelé « arsenic rouge » et l'orpiment (As_2S_3) aussi appelé « arsenic jaune ». L'érosion des roches, le lessivage des sols et les précipitations entraînent une redistribution de l'arsenic vers les compartiments aquatiques et atmosphériques. D'autres sources naturelles d'émission d'arsenic dans l'atmosphère sont l'activité volcanique et les feux de forêts. Dans l'eau de mer, la concentration moyenne d'arsenic peut atteindre $2,6 \mu\text{g.l}^{-1}$, elle est de l'ordre de $0,4 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans l'eau douce (Mukhopadhyay *et al.*, 2002) et dans les sols, cette concentration est comprise entre $0,1$ et 40 mg.kg^{-1} mais peut dépasser 40 g.kg^{-1} près des sites pollués par les activités anthropiques (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

I.2.2.2. Sources anthropiques

De nombreuses activités industrielles et agricoles utilisent l'arsenic et ses composés minéraux et contribuent à rejeter des quantités notables d'arsenic dans l'environnement. En voici quelques exemples :

- ❖ L'industrie métallurgique du cuivre, du plomb, du zinc et de l'or rejette des quantités significatives d'As, ainsi que la combustion de produits fossiles (charbon et fuel) et les fonderies.
- ❖ L'arsenic est utilisé dans les alliages Pb-Sb-As utilisés dans les batteries électriques car il améliore la résistance à la corrosion électrique, et dans la fabrication de semi-conducteurs (arséniure de gallium AsGa).
- ❖ Il est utilisé pour la fabrication de plombs de chasse en association avec le plomb car il augmente la dureté.
- ❖ Il est utilisé comme agent décolorant dans l'industrie du verre, dans les pigments de peinture en association avec le cuivre, pour l'empaillage des animaux et la tannerie.
- ❖ L'arsenic est utilisé comme pesticide (arséniate de plomb), et sous forme CCA (complexe Cu-Cr-As) utilisé pour le traitement du bois (Zagury *et al.*, 2003)
- ❖ L'arsenic est aussi utilisé comme un complément alimentaire, sous forme organique, comme par exemple la Roxarsone $C_6H_6AsNO_6$ (ou acide 3-nitro-4-hydroxyphénylarsonique), dans le but d'augmenter la croissance et d'améliorer la pigmentation des poulets. Il a été montré que cette molécule est ensuite retrouvée dans le fumier sous une forme inorganique (Garbarino *et al.*, 2003 ; Stolz *et al.*, 2007).

I.2.3. FORMES DE L'ARSENIC DANS LES SOLS

L'arsenic existe sous de nombreuses formes différentes et il présente de multiples valences :

- ❖ la valence +V dans le cas de l'acide arsénique $HAsO_4$ sous forme d'ion arséniate AsO_4^{3-} (Figures 2 et 3)
- ❖ la valence +III dans le cas de l'arsénite AsO_3^{3-} (Figures 2 et 3)
- ❖ la valence 0 correspondant à l'arsenic sous forme métal $As(0)$
- ❖ la valence -III pour les composés inorganiques et le gaz arsine AsH_3

Il peut donc exister sous forme organique ou inorganique, l'arsenic inorganique étant généralement considéré comme étant le plus toxique (Mandal et Suzuki, 2002).

Dans un premier temps, les différentes formes inorganiques et organiques de l'arsenic seront exposées d'une manière générale avant de se concentrer sur le comportement de l'arsenic dans les sols.

I.2.3.1. Formes inorganiques

Les deux états d'oxydation les plus courants de l'arsenic sont l'arséniate As(V) et l'arsénite As(III). La figure 2 représente l'influence du potentiel redox (Eh) et du pH sur la spéciation de l'arsenic.

* **En condition oxydante**, la forme inorganique prédominante est l'As(V). Entre pH 2 et 7, l'espèce H_2AsO_4^- est stable alors qu'au-delà de pH 7, il s'agit de l'espèce HAsO_4^{2-} .

* **En condition réductrice**, c'est la forme As(III) qui prédomine, l'espèce la plus stable entre pH 0 et pH 9 étant H_3AsO_3^0 .

➤ Ainsi, les principales espèces d'arsenic inorganique présentes dans les eaux sont l'As(III) sous forme neutre et l'As(V) sous forme anionique.

L'arsine (AsH_3) est un composé gazeux très rare dans le milieu naturel. Cette forme inorganique de l'arsenic est extrêmement toxique et se forme dans des conditions très réductrices et très acides (Cullen et Reimer, 1989).

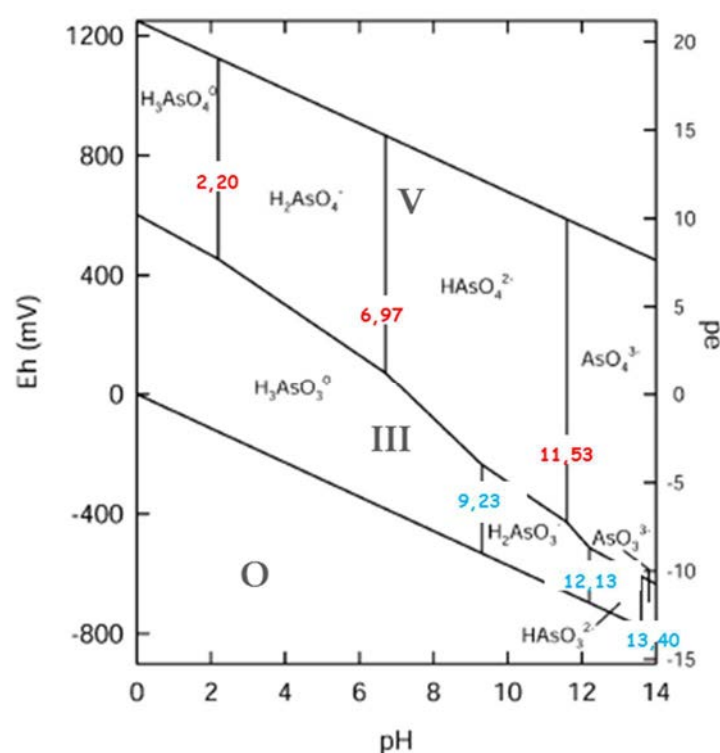


Figure 2 : Diagramme Eh-pH-pe des espèces aqueuses de l'arsenic à 25°C et 1 bar de pression (adapté de Smedley et Kinniburgh, 2002).

Les nombres rouges correspondent au pKa de l'arséniate et les nombres bleus correspondent au pKa de l'arsénite. Les nombres en gris correspondent à l'état de valence des formes arsénées. pe : Potentiel d'oxydation.

I.2.3.2. Formes organiques

Le terme de biométhylation décrit la formation par voie biologique de composés méthylés volatils et non-volatils à partir d'un métal ou d'un métalloïde. Ce processus ne se produit pas uniquement chez les microorganismes mais aussi chez les algues, les plantes et les animaux.

En ce qui concerne l'arsenic, les principaux composés **volatils** formés par biométhylation présentent la structure suivante : $(\text{CH}_3)_n\text{AsH}_{3-n}$ avec $n = 1, 2$ ou 3 . Il s'agit respectivement du mono-, di- et triméthylarsine (Bentley et Chasteen, 2002) issus de la méthylation de l'arsine.

Parmi les composés organiques **non-volatils**, les espèces pentavalentes telles que les acides monométhylarsonique (MMA^{V}), diméthylarsinique (DMA^{V}) et l'oxyde de triméthylarsine (TMAO^{V}) sont plus largement retrouvées que les espèces trivalentes telles que le monométhylarsonite (MMA^{III}) et le diméthylarsinite (DMA^{III}) (Abdullah *et al.*, 1995).

La figure 3 représente les structures chimiques de quelques formes arséniées et s'inspire du mécanisme de méthylation de l'arsenic proposé par Challenger après la seconde guerre mondiale (Challenger, 1945 ; 1951 ; 1955).

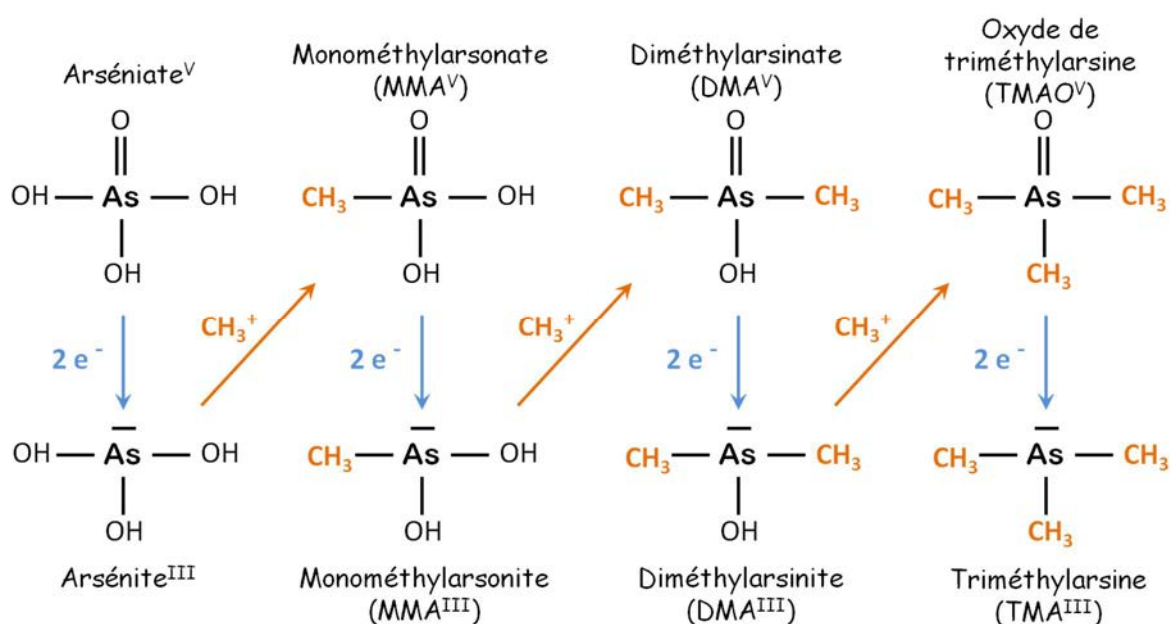


Figure 3 : Mécanismes de biotransformation de l'arsenic inorganique
(adapté de Bentley et Chasteen, 2002 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2002)

Des composés organiques plus complexes comme les sucres et lipides arséniés, l'arsénobétaïne et l'arsénocholine sont essentiellement retrouvés dans les environnements marins. L'arsénobétaïne est le composé arsénié majeur chez les animaux marins comme les

poissons, les crustacés, les mollusques et les échinodermes alors que l'arsénocholone se trouve essentiellement dans les phospholipides contenant de l'arsenic chez les crevettes et les homards. Néanmoins, certaines études ont mis en évidence leurs présences chez les espèces terrestres comme les champignons comestibles (Byrne *et al.*, 1995 ; Kuehnelt *et al.*, 1997).

I.2.3.3. Spéciation de l'arsenic dans les sols et influence des paramètres édaphiques

Les sols ne peuvent pas être considérés comme des milieux homogènes ce qui les amène à contenir des concentrations en arsenic très variables. L'arsenic se trouve essentiellement sous forme inorganique As(V) et As(III) dans les sols mais il peut se lier au matériel organique (Cullen et Reimer, 1989). L'humus joue un rôle crucial en tant que barrière naturelle biogéochimique car cette couche accumule les ETM, limitant ainsi les phénomènes de percolation (Boisson *et al.*, 1999). Par conséquent, les plus importantes teneurs en arsenic sont retrouvées dans les sols riches en carbone organique. En **condition aérobie**, l'As(V) est plus facilement adsorbé sur les phases minérales des sols que l'As(III) et prédomine (Matschullat, 2000). Dans les **sols acides**, l'arsenic s'associe à l'aluminium et au fer pour former $AlAsO_4$ et $FeAsO_4$ alors que l'arséniate de calcium $Ca_3(AsO_4)_2$ est l'espèce dominante dans les **sols basiques et calcaires** (Matschullat, 2000).

Les composés organiques méthylés sont présents dans les sols. Leur origine peut dépendre d'une méthylation directe par les microorganismes ou d'un apport anthropique principalement agricole (pesticides, fertilisants etc.) (Masscheleyn *et al.*, 1991).

La mobilité d'un ETM dans le sol et son écotoxicité dépendent de sa forme physico-chimique mais sont aussi influencées par de nombreux facteurs du sol tels que le pH, le potentiel redox, le climat, la quantité et le type de constituants du sol. Le facteur prédominant, ayant un effet sur la toxicité d'un ETM à travers les biotopes terrestres, est sa biodisponibilité. La biodisponibilité d'un ETM dépend de la nature des organismes et des perturbations imposées par l'environnement (Naidu *et al.*, 2000). La biodisponibilité des ETM est aussi largement gouvernée par le type de sol, la spéciation du contaminant métallique, le vieillissement du sol et la nature des microorganismes (Vig *et al.*, 2003).

➤ Les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol :

Les quantités en matière organique dissoute (MOD) et en substances argileuses jouent un rôle important sur le comportement environnemental de l'arsenic (Wang et Mulligan, 2006). En effet, la MOD peut entrer en compétition avec l'arsenic en ce qui concerne l'adsorption sur les sites des surfaces minérales mais elle peut aussi se lier aux espèces de l'arsenic pour former des complexes dissous ou colloïdaux As-MOD. Ces deux processus peuvent augmenter la mobilité de l'arsenic et influencer la libération de l'arsenic des sols et sédiments vers les eaux profondes (Liu et Cai, 2010 ; Grafe *et al.*, 2002). De récentes études ont montré que la complexation de l'arsénite augmente avec le pH (Liu et Cai, 2010). A la suite de ces travaux, Liu *et al.* (2011) ont suggéré que la présence de MOD augmentait considérablement la dissolution du Fe et de l'Al des sols et permettait la liaison de quantités considérables d'As(III) à travers la formation de complexes As(III)-Fe-MOD.

L'adsorption de l'As(V) (plus importante que celle de l'As(III)) sur les phases minérales solides est affectée par la présence d'ions compétiteurs. Les ions phosphate entrent en compétition d'une manière plus importante avec l'As(V) que les ions sulfate (Goh et Lim, 2004) et les ions silicate (Davis *et al.*, 2001). Ils empêchent donc l'adsorption de l'arsenic sur ces phases solides.

➤ Nature des microorganismes

L'activité microbienne est aussi un facteur susceptible d'influencer la mobilité des ETM comme nous le décrirons dans la partie II de l'état de l'art.

Les microorganismes et notamment les bactéries ont développé différents mécanismes leur permettant de tolérer les ETM ou, dans le cas de l'arsenic, de l'utiliser dans leur métabolisme énergétique, contribuant ainsi à sa mobilité dans les sols. En effet, la conversion de l'As(V) pentavalent en As(III) trivalent est un processus important que l'on considère comme exacerbant la libération de l'arsenic des phases minérales solides vers les eaux souterraines. Par conséquent, la connaissance des mécanismes et des systèmes génétiques impliqués dans la mobilisation, la transformation ou la résistance à l'arsenic, participant directement au cycle biogéochimique de l'arsenic, pourrait permettre de mettre en place des stratégies pratiques pour la bioremédiation de la contamination de l'arsenic. L'ensemble de ces mécanismes bactériens sera développé dans la partie II de ce chapitre.

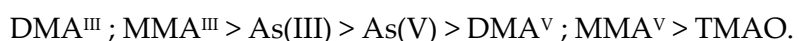
➤ **Vieillessement :** La biodisponibilité d'un ETM diminue en fonction de la durée de son contact avec le sol. En effet, l'âge de la contamination diminue la biodisponibilité de l'arsenic suite à des changements des complexes de surface ce qui conduit à une augmentation du temps de résidence de l'arsenic dans le sol (Fendorf *et al.*, 2004). Une fois adsorbé aux particules du sol, le vieillissement de la pollution conduit au développement de précipités (Aharoni et Sparks, 1991), résultant à la diminution de la biodisponibilité de l'arsenic. Il a donc été montré que sa désorption potentielle et son atténuation naturelle diminuent à travers le temps (Juhasz *et al.*, 2008).

➤ Les vers de terre peuvent également augmenter la mobilité et la disponibilité des ETM dans les sols (Sizmur et Hodson, 2009). Ces mécanismes ne sont encore pas complètement définis mais ils peuvent impliquer, par des processus directs ou indirects, des changements dans les populations microbiennes, le pH, le carbone organique dissous ou la spéciation des ETM (Sizmur *et al.*, 2011).

I.2.4. TOXICITE DE L'ARSENIC

Les effets toxiques de l'arsenic sont fortement dépendants de la dose, du temps d'exposition mais surtout de sa spéciation.

Pendant longtemps, les formes inorganiques solubles ont été considérées comme étant plus toxiques que les formes organiques solubles (Mandal et Suzuki, 2002). Parmi ces formes inorganiques, la toxicité de l'As(III) est reconnue comme étant bien plus élevée que celle de l'As(V) (Mandal et Suzuki, 2002). Depuis, de nombreuses études ont été menées sur les espèces arsénisées méthylées non-volatiles et Hirano *et al.* (2004) ont classé ces espèces, en fonction de leurs toxicités, de la manière suivante :



Ainsi, les espèces méthylées trivalentes (MMA^{III} , DMA^{III}) (Lin *et al.*, 2001) peuvent être plus toxiques que les formes inorganiques, ces dernières étant plus toxiques que les espèces méthylées pentavalentes (DMA^{V} ; MMA^{V}) (Maitani *et al.*, 1987 ; Petrick *et al.*, 2001 ; Styblo *et al.*, 2000 ; Vega *et al.*, 2001).

En revanche, peu de données sont disponibles quant aux espèces volatiles bien que la génotoxicité des arsines ait fait l'objet de quelques études : la première théorie de stress

oxydatif expliquant, en partie, le pouvoir carcinogène de l'arsenic a été présentée par Yamanaka *et al.* (1990). Dans cette étude, le diméthylarsine provoquait des dommages à l'ADN et aux protéines de cellules embryonnaires humaines par la formation de radicaux peroxy ($\text{CH}_3\text{AsOO}\cdot$). Ces résultats ont été confirmés par Andrewes *et al.* (2003) par la mise en évidence de dommages causés par les di- et triméthylarsines sur de l'ADN superenroulé. Ils ont donc montré que ces deux arsines sont environ 100 fois plus toxiques que le DMA^{III}, connu comme étant l'espèce arsénisée non-volatile la plus génotoxique. De plus, Dopp *et al.* (2011) sont parvenus à mettre en évidence la cytotoxicité et la génotoxicité du triméthylarsine par des études *in vitro*, sur des cellules humaines.

Récemment, la formation de composés arséniés volatils par la biocénose intestinale a été découverte ce qui, par conséquent, augmente dangereusement la toxicité de l'arsenic lorsqu'il est ingéré (Diaz-Bone et van de Wiele, 2009).

En France, la concentration maximale admissible dans l'eau de boisson constituant la 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, codifiée en 2003 dans le code de la santé publique. Malheureusement, dans les pays du sud et de l'est de l'Asie, les rivières drainant les eaux de l'Himalaya contiennent de l'arsenic à des concentrations bien supérieures à celle admissible selon l'OMS. Des millions de personnes subissent donc un empoisonnement chronique et sont victimes de lésions de la peau, de maladies respiratoires et cardiovasculaires et de divers cancers (Nordstrom, 2002 ; Reich, 2011).

Il n'y a pas de concentrations limites normalisées d'arsenic dans les sols car cette norme devrait être adaptée au type de sol, ce qui rendrait difficile son application. Les pouvoirs publics de chaque pays définissent donc eux-mêmes cette concentration limite souvent en fonction des activités se déroulant sur les terrains. En Allemagne par exemple, ces teneurs pour l'arsenic total dans les sols varient entre 7 et 40 mg.kg^{-1} de matière sèche (MS) pour les usines, au maximum 20 mg.kg^{-1} de MS pour les aires de jeux des enfants ou encore 35 mg.kg^{-1} de MS pour les terrains de sport (Brandstetter *et al.*, 2000). En France, cette limite est fixée à 37 mg.kg^{-1} de MS pour les zones résidentielles et 120 mg.kg^{-1} de MS pour les zones industrielles (Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 2000).

I.3. ETM DANS L'ENVIRONNEMENT

Cette partie présente une synthèse des généralités, des sources et des formes des ETM considérés dans cette étude, notamment Sb, Cd, Pb et Zn.

I.3.1 ANTIMOINE DANS L'ENVIRONNEMENT

L'antimoine, de symbole Sb, de numéro atomique 51 et de masse atomique égale à 122 g.mol^{-1} (Annexe 1), est un élément dont l'abondance naturelle est faible puisque c'est le 65^{ème} élément constitutif de l'écorce terrestre (Hamilton, 2000). Ses concentrations sont d'environ $0,2 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ dans l'écorce terrestre et $1 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ dans le sol, hors zones polluées (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Les principales formes de l'antimoine sont l'antimoine natif, les composés oxygénés et les sulfures comme par exemple la stibnite (Sb_2S_3).

Les sources d'antimoine stable sont liées aux activités minières et industrielles et au trafic automobile. Il s'agit d'un analogue de l'arsenic avec une toxicité similaire (Ulrich, 1998). L'antimoine est susceptible d'être présent dans les sols sous forme de sulfures très peu solubles ainsi que sous forme d'anions inorganiques, antimonite Sb(III)O_2^- et antimoniate Sb(V)O_3^- et sous diverses formes organiques méthylées (Hammel *et al.*, 2000).

Plusieurs auteurs sont d'accord pour reconnaître que le comportement géochimique de l'antimoine dans les sols reste peu connu, tout en le rapprochant de celui de l'arsenic (Adriano, 1986 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001 ; Edwards *et al.*, 1995). Ces mêmes auteurs sont en revanche d'avis partagés sur la plus ou moins grande mobilité de l'antimoine dans les sols. Ainsi Adriano (1986) et Edwards *et al.* (1995) précisent que quand l'antimoine est présent dans les sols sous forme soluble, il est le plus souvent sous forme d'antimoniate Sb(V) . Kabata-Pendias et Pendias (2001) et Edwards *et al.* (1995) signalent que l'antimoine est souvent présent sous forme complexée avec les acides humiques du sol. En revanche, Kabata-Pendias et Pendias (2001) considèrent que cette forme est très mobile dans l'environnement, alors que Edwards *et al.* (1995) estiment cette mobilité comme très modérée. De la même manière, Edwards *et al.* (1995) considèrent que l'antimoine s'accumule globalement en surface, alors que Kabata-Pendias et Pendias (2001) affirment que sa migration dans les horizons profonds est aisée.

I.3.2. Cd, Zn et Pb DANS L'ENVIRONNEMENT

❖ Le **cadmium**, élément chimique de symbole Cd, de numéro atomique 48 et de masse molaire atomique égale à $112,4 \text{ g.mol}^{-1}$, est le quarante-huitième élément de la classification périodique (Annexe 1). Le cadmium est présent dans la croûte terrestre à une concentration inférieure à $0,1 - 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ (INERIS, 2011). Sa concentration dans l'air varie entre 1 et 5 ng.m^{-3} et elle est inférieure à 1 ng.L^{-1} dans l'eau (Baize, 1997, INERIS 2011). Malgré ces faibles teneurs dans l'environnement, cet ETM est le plus redouté en raison de sa forte toxicité, de sa mobilité et donc de sa facilité à être bioaccumulé dans les organismes ou à migrer en profondeur pour aller contaminer les nappes phréatiques. Dans les sols, les concentrations moyennes en Cd sont de l'ordre de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, mais peuvent atteindre 100 mg.kg^{-1} dans les sols contaminés (Tableau 1 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

❖ Le **plomb** (Pb), de numéro atomique 82, a une masse molaire atomique de $207,2 \text{ g.mol}^{-1}$ (Annexe 1). Il s'agit de l'ETM le moins mobile et il l'est même 100 fois moins que le cadmium (Juste *et al.*, 1995). La concentration du Pb dans la croûte terrestre est d'environ 15 mg.kg^{-1} et de 20 à 50 mg.kg^{-1} dans les sols (Tableau 1).

❖ Le **zinc** (Zn), de numéro atomique 30, a une masse molaire atomique de $65,4 \text{ g.mol}^{-1}$ (Annexe 1). La gamme de concentration rencontrée dans les sols varie entre 10 et 300 mg.kg^{-1} avec une concentration moyenne de 50 mg.kg^{-1} (Baize, 1997).

Le tableau 1 suivant répertorie la teneur moyenne en Cd, Pb et Zn dans les sols et les sols contaminés et les apports anthropogènes de ces ETM.

ETM	Teneur moyenne dans les sols / Teneur dans les sols contaminés (mg.kg ⁻¹)	Apports anthropogènes		
		Epandages et amendements agricoles	Sources minières et industrielles	Activités urbaines et trafic routier
Cd	0,4 / 100	Engrais phosphatés riches en Cd	Raffinages du Zn et du Pb	Incinération des déchets domestiques, boues des stations d'épuration, piles, combustion des carburants fossiles
Pb	20-50 / 100-200	Pesticides à base de plomb (arséniates)	Affinage du plomb, traitement du minerai, récupération des batteries	Gaz d'échappement, boues des stations d'épuration
Zn	50 / 300	Alimentation des animaux (porcs)	Traitement du minerai, raffinage, manières plastiques et caoutchouc	Toitures et gouttières, usure des pneumatiques, incinérations d'ordures

Tableau 1 : Teneurs moyennes et origines du Cd, Pb et Zn dans les sols (Baize, 1997 ; Deneux-Mustin et al., 2003)

Le comportement du Cd se rapproche de celui du Zn. Ils possèdent tous deux deux états de valence (0, +II). Le cadmium, dans l'environnement, est essentiellement retrouvé dans son état d'oxydation principal c'est-à-dire +II. Les principaux composés minéraux contenant du Cd à l'état naturel sont sous la forme de chlorure CdCl₂, d'oxyde CdO, de sulfate CdSO₄ ou encore de sulfure CdS (INERIS, 2011).

Le zinc est un ETM nécessaire à toute forme de vie mais à de fortes concentrations, il peut être très toxique. Bien que le zinc ne soit pas un élément sensible aux variations de potentiel redox (figure 4), dans des milieux réducteurs, la formation de sulfure en phase aqueuse ou en phase solide est le processus contrôlant la disponibilité de ce métal dans l'environnement. Les principaux minerais du zinc sont les minerais sulfurés, carbonatés, silicatés et oxydés (INERIS 2010).

Le plomb est l'ETM le plus répandu à la surface de la Terre. A la différence du Cd et du Zn, il possède trois états de valence (0, +II et +IV) mais il n'est présent dans les eaux naturelles que sous sa forme divalente. Il forme à l'état naturel des complexes inorganiques tels que des complexes carbonatés (PbCO₃) ou sulfatés (PbSO₄).

Ces trois ETM sont donc présents dans les eaux naturelles sous leurs formes divalentes, plus précisément lorsque les pH sont inférieurs à 9 pour le Cd, à 6 pour le Pb et à 8 pour le Zn (Figure 4). Dans ces conditions de pH acides à neutres, ces ETM sont susceptibles de former des complexes avec les ions chlorure, phosphate et sulfate et ainsi de s'adsorber sur des surfaces minérales. Le changement de pH affecte la sorption du Cd par les sols et par conséquent sa concentration en solution (Naidu *et al.*, 1997). En 2000, Sterckeman *et al.* ont analysé les horizons de 12 profils de sol afin de comparer les distributions verticales du Cd, Zn et Pb. A travers cette étude, ils sont parvenus à classer la mobilité de ces ETM de la manière suivante : $Cd \gg Pb \geq Zn$. Les plus fortes concentrations ont été observées dans les horizons de surface (20-30 cm) et les mobilités du Cd et du Zn augmentent avec une diminution du pH et une augmentation de la quantité de sable présent dans le sol. De plus, la mobilité du zinc augmente parallèlement à une augmentation du carbone organique dans l'horizon de surface.

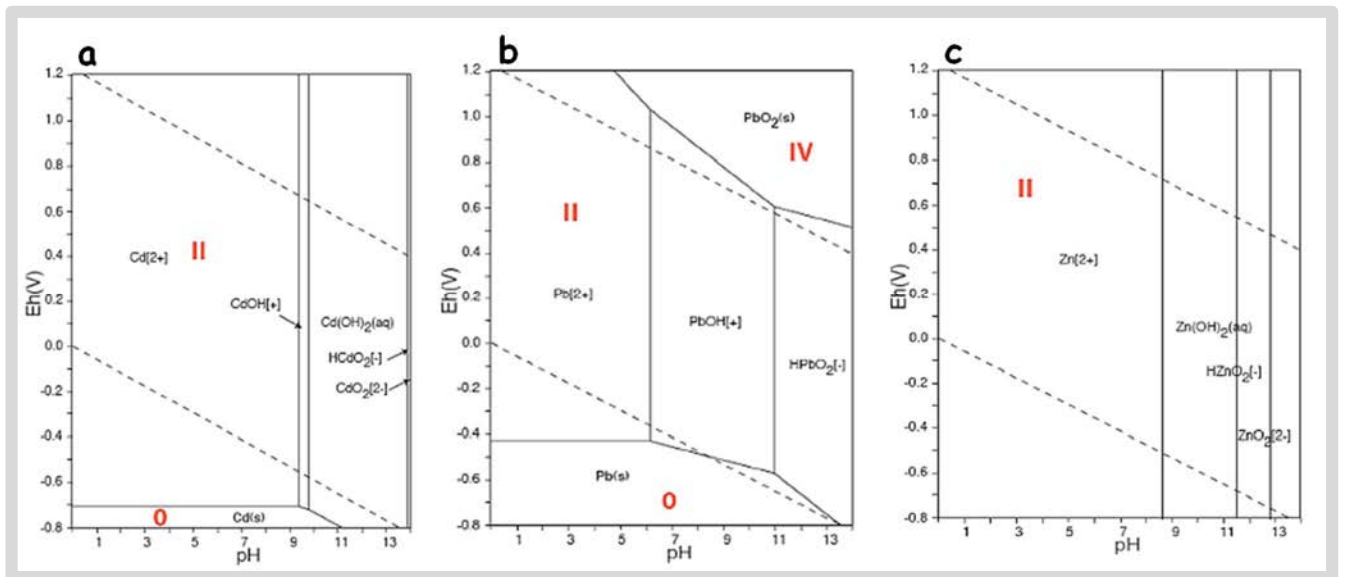


Figure 4 : Diagramme Eh-pH des espèces aqueuses du Cd (a), Pb (b) et Zn (c) à 25°C et 1 bar de pression (Takeno, 2005).

PARTIE II : MECANISMES DE RESISTANCE DES BACTERIES AUX ELEMENTS EN TRACES METALLIQUES

II.1. INTERACTIONS MICRO-ORGANISMES - ETM

Les métaux et métalloïdes sont présents dans les sols, les sédiments et, à plus faibles concentrations, dans les eaux. Ils proviennent naturellement de l'altération des roches, mais des concentrations plus importantes peuvent avoir des origines anthropiques telles que l'exploitation minière, le stockage, l'incinération de déchets ou l'activité industrielle (fonderies) (Partie I de l'état de l'art). La toxicité, la disponibilité et le transport des ETM dans l'environnement sont fonction de leur spéciation chimique, c'est-à-dire de la forme chimique sous laquelle ils se trouvent. Les micro-organismes peuvent intervenir dans cette spéciation et donc influencer sur leur devenir dans un écosystème. Les processus de réduction des ETM qui conduisent le plus souvent à une réduction de leur solubilité et de leur toxicité peuvent être appliqués dans le traitement des sites pollués. Des processus physico-chimiques et biologiques peuvent aussi intervenir tels que l'adsorption, l'immobilisation grâce à des agents chélateurs, la précipitation indirecte ou l'accumulation. Il existe enfin des phénomènes de résistance aux ETM qui peuvent également participer à leur élimination. L'ensemble de ces processus bactérien sont schématisés dans la figure 5.

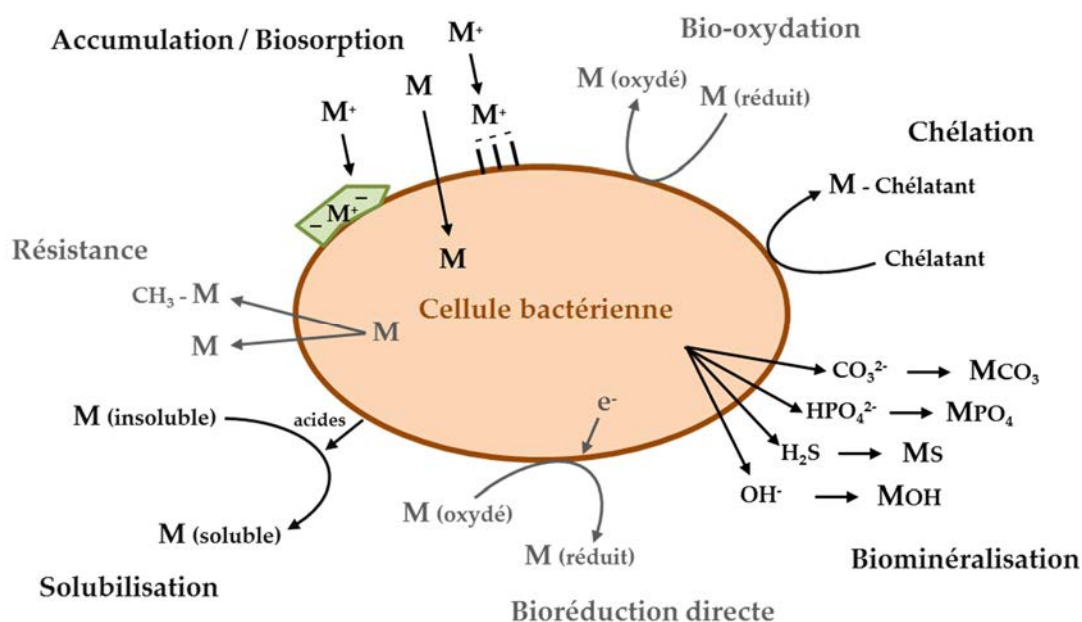


Figure 5 : Synthèse des processus bactériens intervenant dans la spéciation, le piégeage ou l'accumulation des ETM (adapté de Bertrand et al., 2011)

II.2. MECANISMES BACTERIENS DE RESISTANCE A L'ARSENIC ET A L'ANTIMOINE

II.2.1. LE SYSTEME *ars*

II.2.1.1. Organisation génétique de l'opéron *ars*

En raison de son analogie structurale avec le phosphate, l'As(V) entre dans les cellules bactériennes *via* des systèmes membranaires de transport du phosphate comme, par exemple, les systèmes Pit et Pst chez *Escherichia coli* (Willsky et Mallamy, 1980). En revanche, l'As(III) qui n'est pas chargé à des pH proches de la neutralité, est transporté dans les cellules par des aqua-glycéroporines, canaux hydriques perméables au glycérol (Sanders *et al.*, 1997).

Le système bactérien de résistance à l'arsenic le plus connu est le système *ars*. Il permet aux bactéries de résister aux deux formes inorganiques d'arsenic en réduisant l'As(V) en As(III) qui est ensuite expulsé hors de la cellule mais aussi de résister à l'antimoine sous la forme Sb(III) (Novick et Roth, 1968 ; Silver *et al.*, 1981). Les gènes *ars*, largement répandus chez les bactéries et les archae, sont souvent agencés en opérons. Ils sont localisés aussi bien sur les chromosomes (*E. coli*, *B. subtilis*) (Carlin *et al.*, 1995 ; Diorio *et al.*, 1995) que sur les plasmides

isolés chez les bactéries à Gram négatif tels que ceux d'*E. coli* R773 (Chen *et al.*, 1986) et R46 (Bruhn *et al.*, 1996) ou isolés chez des bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus* sp. (Silver *et al.*, 1981). L'opéron *ars* peut comporter un minimum de trois gènes nommés *arsB*, *arsC* et *arsR*, information amenée par des études de ces opérons chez *E. coli* (Carlin *et al.*, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Cai *et al.*, 1998) et *Staphylococcus* (Rosenstein *et al.*, 1992, Silver *et al.*, 1981). En revanche, certains opérons *ars* comme, par exemple, celui porté par le plasmide pKW301 d'*Acidiphilium multivorum* (Suzuki *et al.*, 1998) possèdent 5 gènes : *arsRDABC*.

L'As(V) n'est pas reconnu par les transporteurs d'As(III). Une As(V)-réductase cytoplasmique codée par le gène *arsC* catalyse d'abord la réduction de l'As(V) en As(III) en utilisant la thiorédoxine ou la glutarédoxine comme donneur d'électrons (Silver et Phung, 2005). Ce processus sera décrit plus précisément dans le paragraphe II.2.2.2.1.

Le gène *arsR* code un répresseur transcriptionnel et le gène *arsB* code une protéine membranaire. Deux gènes supplémentaires, moins connus, peuvent aussi se trouver dans l'opéron *ars* : *arsA* codant une sous-unité ATPasique soluble et *arsD* codant une métallochaperone qui conduit l'As(III) vers ArsA (Rosen *et al.*, 1999). Les protéines ArsA et ArsB s'assemblent pour former un complexe ArsA/ArsB qui fonctionne comme une pompe de détoxification et permet ainsi de réduire la concentration intracellulaire en As(III) (Tisa et Rosen, 1990 ; Lin *et al.*, 2006).

Il existe également un troisième type d'opéron, découvert chez un plasmide de *Yersinia enterocolitica* constitué des 3 gènes *arsRBC* mais aussi du gène *arsH* qui est absolument indispensable à la résistance de la bactérie à l'Arsenic et homologue avec aucun des gènes *ars* connus jusqu'à maintenant (Neyt *et al.*, 1997).

En 2008, Branco *et al.* se sont focalisés sur la souche *Ochrobactrum tritici* SCII24, une souche hautement résistante aux ETM et ils ont testé sa résistance à l'As(III), l'As(V) et Sb(III). Cette souche est capable de se développer en présence de 50 mM d'As(III), 10 mM de Sb(III) et de 200 mM d'As(V). Ils ont également mis en évidence chez cette souche deux opérons de résistance à l'arsenic et à l'antimoine, appelés *ars1* et *ars2* (figure 6). Ces opérons ont été clonés chez des souches d'*E. coli* délétées de l'opéron *ars* ce qui a permis de préciser que la résistance induite par *ars1* concernait l'As(III) et le Sb(III) et celle induite par *ars2* concernait l'As(V) et l'As(III). Il s'agit de la première bactérie contenant deux opérons de résistance, chacun d'eux conférant une résistance à différents ETM ou à différents états d'oxydation d'un même ETM.

De plus, ces opérons témoignent d'une organisation génétique inhabituelle comme, par exemple, la présence d'un ORF codant une protéine avec un domaine CBS (Cystathionine- β -Synthase), généralement observé chez les protéines ayant un rôle de régulateur, ou encore l'absence de gène *arsC* dans l'opéron *ars1* alors que ce gène est présent en double dans l'opéron *ars2*. Ces travaux soulignent la complexité et la diversité des stratégies bactériennes pour résister à l'arsenic et à l'antimoine. Pour illustrer cette complexité, Paez-Espino *et al.* ont synthétisé en 2009 les différents arrangements des opérons *ars* jusqu'alors découverts. En 2010, Achour-Rokbani *et al.* ont caractérisé un cluster original de gènes *ars* chez la souche *Microbacterium* sp. A33, isolée d'un sol contaminé à l'arsenic (Achour *et al.*, 2007) et tolérant de fortes concentrations d'As(V) et d'As(III).

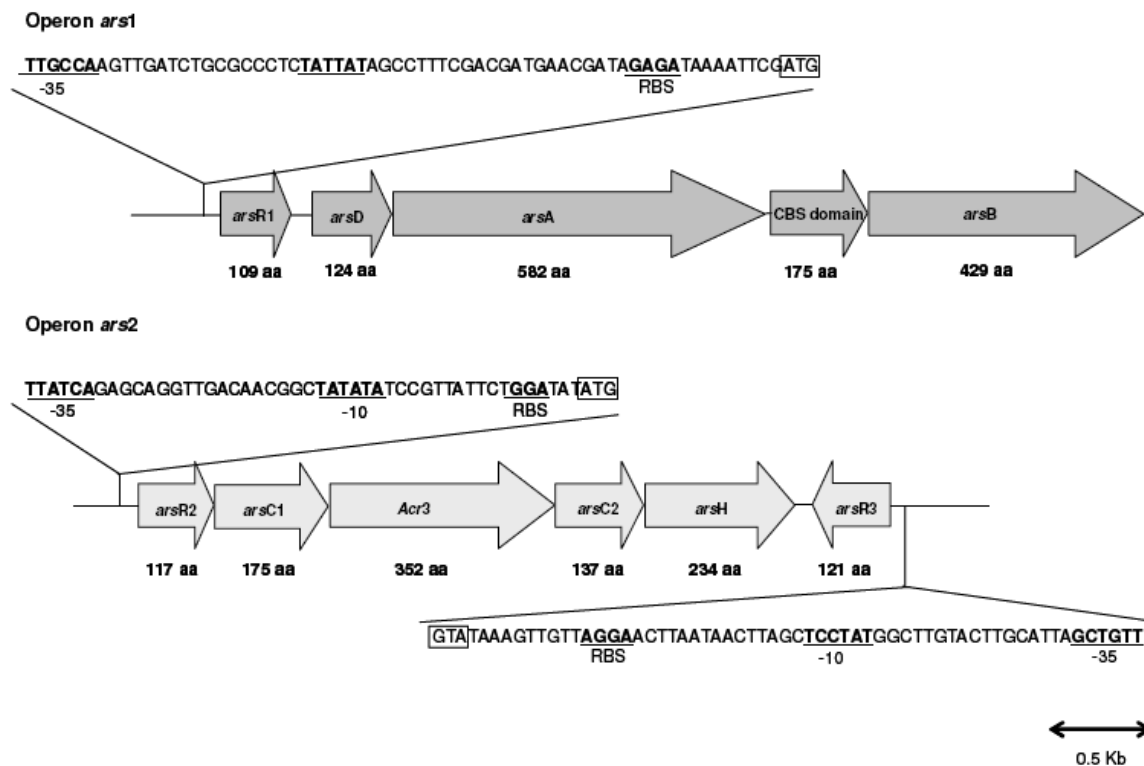


Figure 6 : Organisation génétique des 2 opérons *ars1* et *ars2* chez la souche *Ochrobactrum tritici* SCII24 (Branco *et al.*, 2008). Les régions promotrices -35 et -10 et les sites de fixation des ribosomes (RBS) sont en gras. Les codons ATG sont encadrés.

II.2.1.2. Régulation de l'opéron *ars*

San Francisco *et al.* (1990) ont identifié le rôle de la protéine ArsR et montré le pouvoir répresseur de cette protéine, en surexprimant et purifiant la protéine chez *E. coli*. Depuis, de nombreuses études ont confirmé que cette protéine est un répresseur transcriptionnel (Wu et

Rosen, 1993). En absence d'inducteur (As(III) ou Sb(III)), une expression basale de l'opéron *ars* est observée alors que quand l'inducteur est présent, ArsR est libéré de l'opérateur de l'opéron, conduisant à une augmentation de l'expression des gènes *ars* (Carlin *et al.*, 1995). Dans cette étude, l'expression des protéines a été contrôlée par Western Blot avec des anticorps spécifiques des protéines ArsR et ArsC. En absence d'inducteur, peu de protéines ArsR ont été visualisées par Western Blot. Un niveau basal de protéine ArsC a été observé et ce niveau augmente considérablement en présence d'As(III) ce qui démontre l'induction de l'expression. En revanche, il n'a jamais été possible de cibler les protéines ArsB avec des anticorps anti-ArsB et donc le taux de production de cette protéine n'a pas pu être déterminé. Au moment de cette étude, les auteurs émettaient l'hypothèse que les différences observées dans la résistance conférée par les opérons présents dans les chromosomes ou dans les plasmides pourraient être dues à une expression différentielle des gènes *arsB*.

En 2009, les travaux de Murphy et Saltikov avaient pour objectif de déterminer comment les voies de détoxification et de respiration de l'As(V) étaient régulées en réponse à l'As(III) chez la bactérie *Shewanella* sp. ANA-3, réduisant les métaux. Ils ont montré qu'un mutant délété pour le gène *arsR2* se développait mieux en présence d'une forte concentration en As(III). L'explication est que la transcription des gènes *ars* était élevée chez ce mutant donc la conclusion principale est que ArsR est un répresseur transcriptionnel de l'expression des gènes *ars* mais aussi des gènes *arr*, gènes que nous décrivons dans le paragraphe II.2.2.2.2.

II.2.1.3. Les pompes d'efflux de l'arsénite ArsB/ACR3p

Le gène *arsB*, appartenant à l'opéron *ars*, décrit dans le paragraphe précédent, code une protéine membranaire qui pompe l'As(III) hors de la cellule, comme un uniporteur, en utilisant le potentiel membranaire (Rosen *et al.*, 1999 ; Tisa *et al.*, 1990). Le cluster des trois gènes *ACR1*, *ACR2*, *ACR3* a été isolé pour la première fois en 1997 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bobrowicz *et al.*, 1997). Il a été montré que ce cluster, lorsqu'il est inséré dans un plasmide à grand nombre de copies, confère une augmentation de la résistance à l'As(III) d'un facteur 10 chez les levures sauvages (Bobrowicz *et al.*, 1997). Cette seconde famille de transporteurs a été moins caractérisée et elle inclut le gène *arsB* (ORF1) de *Bacillus subtilis* et le gène *ACR3* de *S. cerevisiae* possédant donc des protéines similaires pour l'export d'As(III) (Bobrowicz *et al.*, 1997 ; Takemaru *et al.*, 1995, Wysocki *et al.*, 1997).

La protéine **Acr1p** est un facteur de transcription qui induit l'expression des gènes *ACR2* et *ACR3* à partir d'une région promotrice commune en réponse à l'As(III), l'As(V) et Sb(III) (Bobrowicz *et al.*, 1997 ; Wysocki *et al.*, 2004 ; Ilina *et al.*, 2008). **Acr2p** est une As(V)-réductase qui convertit l'As(V) en As(III) (Mukhopadhyay *et al.*, 1998 ; Mukhopadhyay et Rosen, 2002), alors que **Acr3p** constitue la voie d'exclusion de l'As(III) (Wysocki *et al.*, 1997 ; Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2010). Acr3p est le membre « prototype » de la famille des transporteurs « arsenical compound resistance-3 » (Acr3) qui appartient à la famille BART (bile/arsenite/riboflavin transporter) (Mansour *et al.*, 2007). La première séquence du gène *ACR3* a été identifiée dans le génome de *Bacillus subtilis* (Takemaru *et al.*, 1995).

Chez les micro-organismes, Acr3p est localisé dans la membrane plasmique afin d'exporter l'As(III) hors de la cellule. Cependant, chez la plante hyperaccumulatrice *Pteris vittata*, Acr3p est présente dans la membrane vacuolaire des gamétophytes ce qui suggère que chez les organismes pluri-cellulaires, Acr3p peut permettre la séquestration de l'As(III) dans les vacuoles (Indriolo *et al.*, 2010).

II.2.2. LES MECANISMES DE BIOTRANSFORMATION DE L'ARSENIC

Les mécanismes de biotransformation de l'arsenic, décrits dans ce paragraphe, concernent les processus d'oxydation aérobie hétérotrophe et chimiolithoautotrophe de l'As(III), de respiration anaérobie de l'As(V) et de réduction cytoplasmique de l'As(V).

II.2.2.1. Les arsénite-oxydases

Bacillus arsenoxidans est la première bactérie oxydant l'As(III) décrite dans la littérature (Green, 1918). Depuis, de nombreuses bactéries capables d'oxyder l'As(III) ont été identifiées. Ces bactéries sont réparties en deux groupes distincts : les bactéries hétérotrophes appelées HAO (heterotrophic arsenite oxydizers) et les bactéries chimiolithoautotrophes appelées CAO (chemolithoautotrophic arsenite oxydizers) (Quéméneur, 2008). Dans la majorité des cas, ces microorganismes sont aérobies, utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons mais, il existe aussi certaines espèces de bactéries chimiolithoautotrophes anaérobies (§ II.1.3)

Le gène *aioA*, précédemment appelé *asoA* ou *aroA* et récemment *aoxB* (Lett *et al.*, 2011), code la sous-unité catalytique de l'As(III)-oxydase, qui est constituée de deux sous-unités. Elle forme un clade au sein de la famille des diméthyl-sulfoxide (DMSO) réductases des

molybdoenzymes (Silver et Phung, 2005 ; Oremland *et al.*, 2009) comme l'illustre ci-après la figure 7.

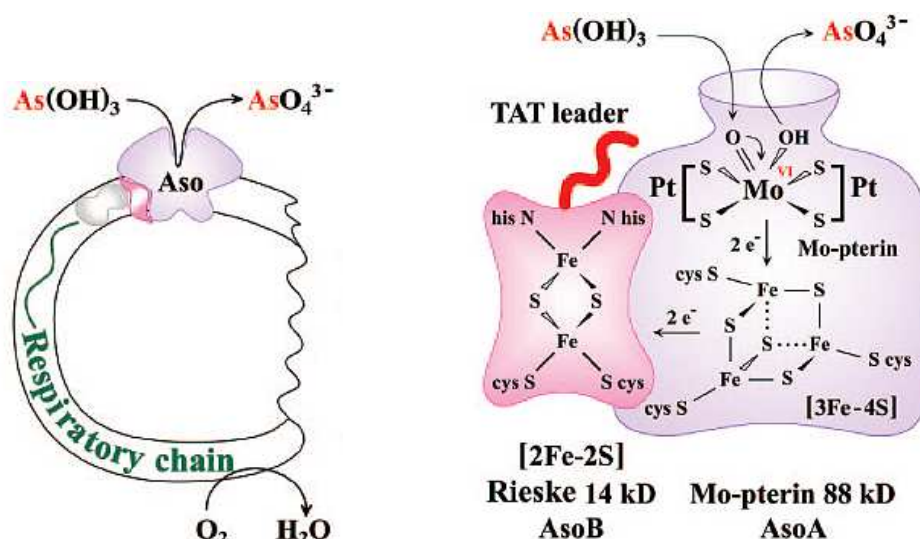


Figure 7 : Localisation cellulaire et fonction du système d'oxydation de l'As(III) (A gauche, d'après Silver et Phung, 2005). Modèle de l'As(III)-oxydase d'*Alcaligenes faecalis* (A droite, d'après Silver et Phung, 2005).

Aso est l'arsénite oxydase. *AsoA* est la grosse sous-unité catalytique contenant un cofacteur à molybdène et *AsoB* est la petite sous-unité qui sert au transfert des électrons.

Depuis, de nombreuses bactéries As(III) – oxydantes, phylogénétiquement différentes, ont été isolées d'environnements variés ce qui suggère que, tout comme les gènes *ars*, les gènes *aioA* sont abondants, largement distribués et présents chez les bactéries et les archae (Silver et Phung, 2005). Les bactéries As(III)-oxydantes semblent jouer un rôle majeur dans la transformation et la mobilité de l'arsenic dans l'environnement (Inskeep *et al.*, 2002). L'As(III) étant la forme de l'arsenic la plus mobile et une des formes arséniées les plus toxiques, son oxydation en As(V), moins toxique et peu mobile peut contribuer à une atténuation naturelle des milieux contaminés. Ainsi, plusieurs études suggèrent que le gène *aioA* pourrait constituer un marqueur moléculaire du potentiel d'oxydation et d'atténuation naturelle de l'arsenic dans les milieux pollués (Inskeep *et al.*, 2007 ; Quéméneur *et al.*, 2008).

La régulation de l'expression des gènes *aio* a été étudiée chez *Agrobacterium tumefaciens* et l'oxydation de l'As(III) serait régulée par un système à deux composants AioRS : le gène *aioS* code une histidine-kinase putative et le gène *aioR* code un régulateur transcriptionnel activé par AioS (Kashyap *et al.*, 2006). Récemment, la fréquente occurrence du gène *aioX* chez les bactéries As(III) – oxydants a conduit Liu *et al.* (2011) à étudier son rôle. Ils ont montré que ce gène code une protéine périplasmique liant l'As(III). L'expression du gène *aioX* est induite par

l'As(III) et la protéine correspondante a un rôle essentiel dans la régulation des gènes *aioB* et *aioA* et donc dans l'oxydation de l'As(III) en As(V).

Quéméneur *et al.* (2010) ont développé des outils de quantification par PCR en temps réel et d'empreinte moléculaire par DGGE du gène *aioA* à l'aide d'amorces dégénérées spécifiques. De tels outils ciblant les gènes *aioA* pourraient permettre de prédire le potentiel d'oxydation biologique de l'As(III) dans un sol et sa capacité de bioremédiation. Toutefois, les relations entre les facteurs environnementaux, la structure et l'abondance de ce groupe fonctionnel n'ont pas encore été montrées.

II.2.2.2. Les arséniate-réductases

II.2.2.2.1. Arséniate-réductase cytoplasmique

Les As(V)-réductases cytoplasmiques ArsC codées par l'opéron *ars*, sont largement distribuées chez les microorganismes (Silver and Phung, 2005). Il s'agit de petites protéines (environ 13-16 kDa) qui catalysent la réduction de l'As(V) en As(III) comme le montre la figure 8. L'analyse phylogénétique des séquences protéiques permet de distinguer trois clades qui partagent une même fonction biochimique. Le premier groupe d'As(V)-réductases, qui est également le mieux étudié, rassemble les enzymes glutathione/glutarédoxine dépendantes (clade Grx / GSH) et est représenté par la protéine ArsC du plasmide R773 d'*E. coli*. Le second groupe comporte les enzymes thiorédoxine-dépendantes (clade Trx) et il est représenté par ArsC du plasmide pI258 de *Staphylococcus aureus* et le troisième groupe rassemble les enzymes glutarédoxine-dépendantes telles que la protéine Arr2p de *S. cerevisiae* (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

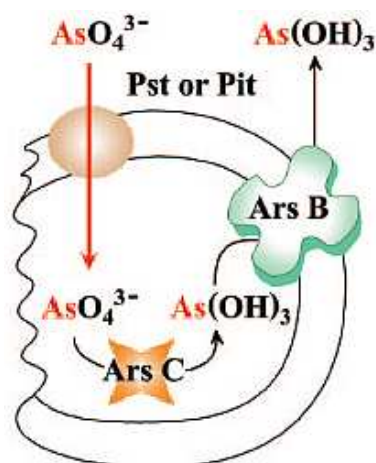


Figure 8 : Localisation cellulaire et fonction des composants du système Ars (d'après Silver et Phung, 2005). Pst et Pit sont les transporteurs de phosphate, ArsC est l'arséniate réductase cytoplasmique et ArsB est la pompe d'efflux de l'As(III).

II.2.2.2.2. Arséniate-réductase respiratoire

La capacité que possèdent les microorganismes à influencer sur la mobilité de l'arsenic dans les milieux naturels à travers des processus d'oxydo-réduction a conduit à la découverte de la première bactérie respirant l'As(V) (Ahmann *et al.*, 1994). La réduction respiratoire dissimilatrice de l'As(V) en As(III) est catalysée par des enzymes différentes de celles impliquées dans le système bactérien de résistance à l'arsenic ArsC (Mukhopadhyay *et al.*, 2002 ; Rosen, 2002). Les As(V)-réductases respiratoires (ARR) peuvent être des enzymes réversibles, fonctionnant chez certains microorganismes comme des As(V)-réductases et chez d'autres comme des As(III)-oxydases mais cette réversibilité a été mise en évidence *in vitro* (Richey *et al.*, 2009). Alors que l'As(V)-réductase ArsC est petite, soluble, cytoplasmique et nécessite la glutathione ou la glutarédoxine réduites (Gladysheva *et al.*, 1994 ; Ji *et al.*, 1994), ARR est une protéine membranaire associée à la chaîne respiratoire (figure 9). Depuis sa découverte chez *Chrysiogenes arsenatis* (Krafft et Macy, 1998), les ARR ont été identifiées chez plus de 30 espèces bactériennes (Stolz *et al.*, 2010) comme le montre la figure 10. Nous savons, depuis que Saltikov *et al.* (2003) ont isolé et caractérisé génétiquement la souche *Shewanella* sp. ANA-3, que l'activité de réduction respiratoire de l'As(V) est codée par un cluster de deux gènes (*arrAB* ; arsenate respiratory reduction) (Saltikov et Newman, 2003).

Les ARR appartiennent, tout comme les As(III)-oxydases, à la famille des diméthyl-sulfoxyde réductases (DMSO) des molybdoenzymes. Elles sont donc constituées d'une grande sous-

unité ArrA contenant un cofacteur à molybdène et un centre [4Fe-4S] et une petite sous-unité ArrB qui peut contenir jusqu'à 4 centres [4Fe-4S] (Silver et Phung, 2005).

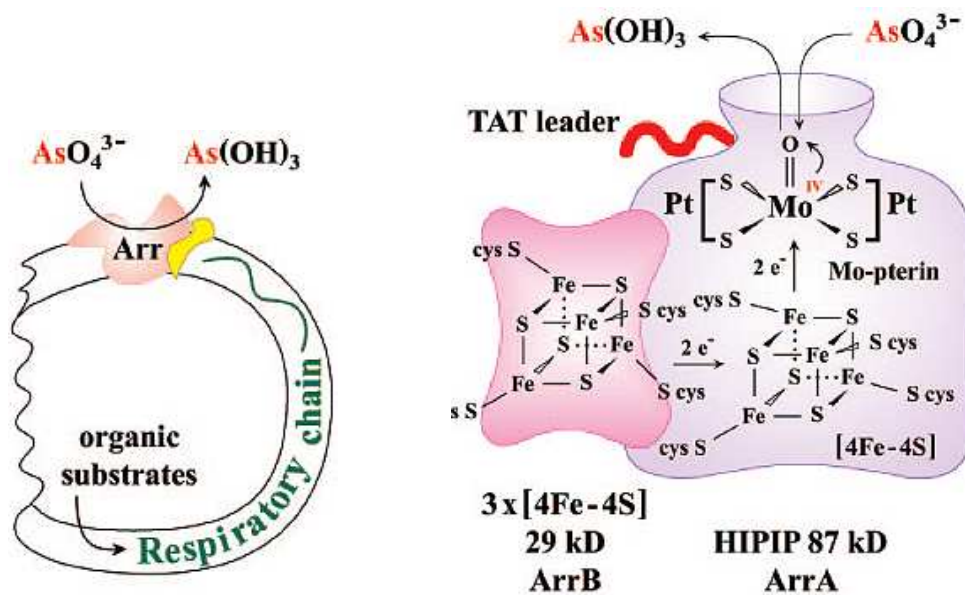


Figure 9 : Localisation cellulaire et fonction du système de respiration de l'As(III) (A gauche, d'après Silver et Phung, 2005). Modèle de l'As(V)-réductase respiratoire de *Chrysiogenes arsenatis* (A droite, d'après Silver et Phung, 2005).

Arr est l'arséniate réductase respiratoire. *ArrA* est la grosse sous-unité catalytique contenant un cofacteur à molybdène et *ArrB* est la petite sous-unité qui sert au transfert des électrons.

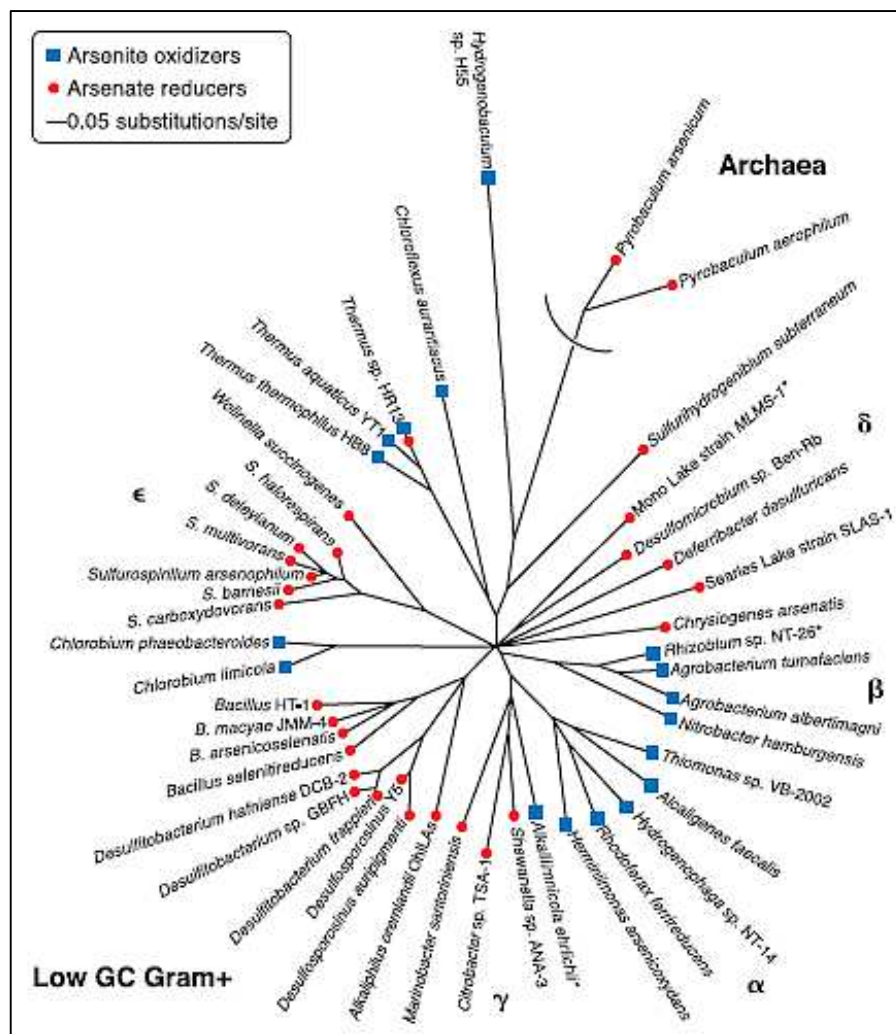


Figure 10 : Diversité phylogénétique des Bactéries et Archae métabolisant l'arsenic (Stolz et al., 2010)

II.2.3. PHENOMENES DE BIOTRANSFORMATION DE L'ARSENIC DANS LES MILIEUX NATURELS

L'impact des processus microbiens sur la mobilité de l'arsenic est bien documenté. Un certain nombre des travaux dans ce domaine ont été réalisés au laboratoire dans des conditions éloignées des conditions réelles d'un sol. Toutefois, d'autres études effectuées *in situ* montrent la complexité des mécanismes impliqués et aussi l'importance écologique et parfois sanitaire de mieux les appréhender.

Ainsi, on peut citer les travaux effectués sur le lac Mono, lac salé (70 à 90 g.l⁻¹ de sels), situé en Californie dans une ancienne caldeira, écosystème original et extrême présentant un pH très alcalin (pH 10). La teneur en arsenic inorganique dissous avoisine 200 µM. De nombreux microorganismes haloalcaliphiles y sont retrouvés, c'est-à-dire des microorganismes pouvant

se développer dans des conditions extrêmes de salinité et dans les environnements alcalins. Oremland *et al.* (2002) ont isolé, parmi ces populations, des bactéries hétérotrophes As(V) - réductrices (*Bacillus selenitireducens*), chimiolithoautotrophes As(V) - reductrices, photoautotrophiques As(III) - oxydantes et chimiolithoautotrophes As(III) - oxydantes telles que la souche MLHE-1 d'*Alkalilimnicola ehrlichii* (Figure 11). Cette souche, en culture pure, est capable de se développer en utilisant l'As(III) comme donneur d'électrons et le nitrate en tant qu'accepteur d'électrons mais seulement en condition anaérobie. Cette oxydation de l'As(III) a un impact sur la mobilité de l'arsenic dans les aquifères dans lesquels la teneur en MOD est faible ce qui conduit l'As(V) à être fortement adsorbé sur les surfaces minérales. Depuis ces travaux, Zargar *et al.* (2012) ont identifié chez cette cyanobactérie *A. ehrlichii* un gène *arxA* codant une As(III)-oxydase anaérobie. L'hypothèse que ces bactéries aient fait partie des premières bactéries à peupler la Terre primitive a été émise (Stolz *et al.*, 2010).

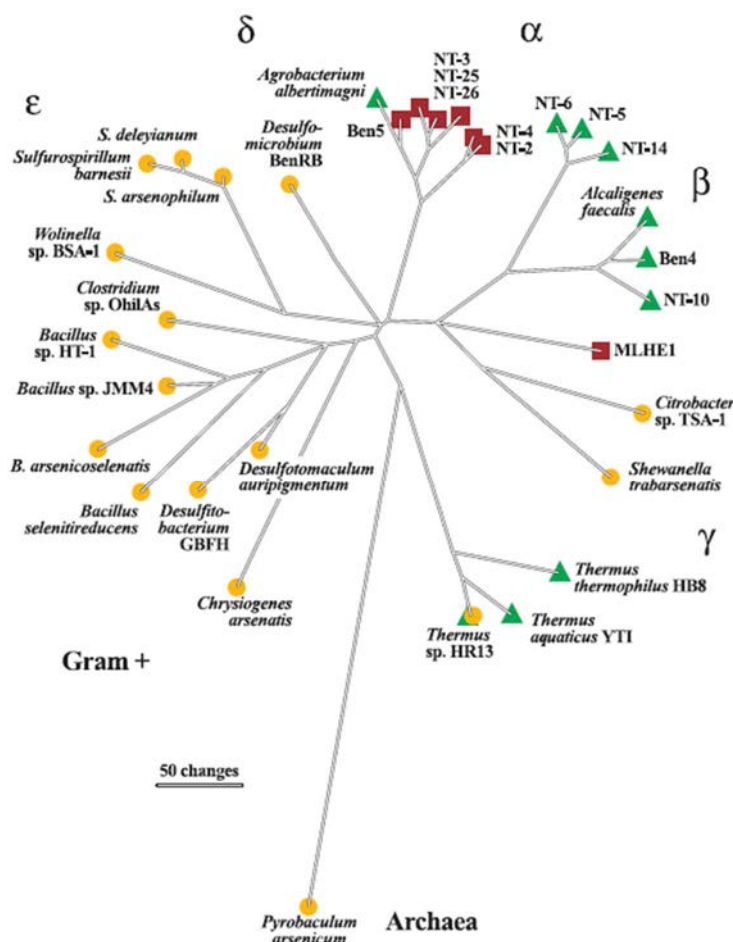


Figure 11 : Diversité phylogénétique des procaryotes métabolisant l'arsenic (Oremland et Stolz, 2003).

Les micro-organismes pratiquant l'As(V)-réduction dissimilatrice (DARP) sont représentés par des cercles jaunes, les procaryotes hétérotrophes As(III)-oxydants (HOA) sont représentés par des triangles verts et les procaryotes chimiolithoautotrophes As(III)-oxydants (CAO) sont représentés par des carrés rouges. La souche *Thermus* sp. HR13 est capable de respirer l'As(V) et d'oxyder l'As(III).

De nombreux travaux concernent des sites/régions contaminés à l'arsenic comme ceux situés au Bangladesh, contenant à la fois du nitrate et de l'arsenic et posant de graves problèmes sanitaires (Islam *et al.*, 2004 ; van Geen *et al.*, 2004 ; Gault *et al.*, 2005 ; Hery *et al.*, 2010). Depuis le début des années 70, la moitié de la population du Bangladesh consomme une eau contaminée par de l'arsenic à des concentrations bien supérieures à celle admissible selon l'OMS ($10 \mu\text{g.l}^{-1}$). Pour contourner ce problème, au cours de la dernière décennie, des puits plus profonds ont été construits mais, ils ont été contaminés par l'arsenic provenant du sol et des aquifères de plus faibles profondeurs. Par la mise en place d'expériences en microcosmes de sol naturel et de sable provenant d'Inde, du Bangladesh et du Cambodge, de nombreuses études ont conclu à la libération d'arsenic dans les aquifères par l'ajout de donneurs d'électrons de formes variables, bien que ce processus soit d'abord basé sur la réduction des minéraux de fer (Islam *et al.*, 2004 ; Hery *et al.*, 2010). Cependant, en 2011, Dhar *et al.* ont montré que la souche *Shewanella* sp. ANA-3 était impliquée dans la libération d'As(III) sans réduire nécessairement le Fe ni nécessiter un apport de source de carbone métabolisable.

L'étude des communautés bactériennes dans des sols pollués à l'arsenic est un domaine bien renseigné mais peu d'informations sont disponibles au sujet des bactéries résistantes à l'arsenic dans la rhizosphère associée à des plantes endémiques de ces sols. En 2010, Cavalca *et al.* ont apporté de nouveaux renseignements sur cette diversité bactérienne et donc sur les gènes de résistance dans ces habitats. Pour cela, ces auteurs ont étudié la communauté rhizobactérienne de l'espèce de chardon *Cirsium arvense* (L.), une plante sauvage, pérenne et poussant dans des sols contaminés à l'arsenic en Toscane (Italie). A travers cette étude, cette équipe a montré que les isolats arsenic-résistants appartiennent à 13 genres bactériens dont les majoritaires sont *Bacillus*, *Achromobacter* ou encore *Brevundimonas*. Parmi ces bactéries isolées, la plupart se développent en présence de fortes concentrations en arsenic (supérieures à 100 mM As(V) et 10 mM As(III)) et la majorité des souches possède les gènes *arsC*, *arsB* et *ACR3* en sachant que le génotype *arsB* prédomine sur le génotype *ACR3*. Ils ont également mis en évidence une population bactérienne As(III)-oxydante plus présente que la population As(V) – réductrice ce qui suggère que les bactéries As(III)-oxydantes jouent un rôle protecteur envers la plante *C. arvense*.

II.3. MECANISMES DE RESISTANCE BACTERIENS AU Cd, Zn ET Pb :

LES ATPases DE TYPE P

Assurer l'homéostasie des métaux de transition présente un réel challenge pour tous les organismes vivants. **Les ATPases de type P** constituent une superfamille de protéines transportant les ions métalliques contre le gradient de concentration en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Moller *et al.*, 1996). Elles permettent ainsi de diminuer la quantité cytoplasmique en ETM en les expulsant hors de la cellule, limitant ainsi leurs effets toxiques. La comparaison des séquences primaires, la prédiction de leurs arrangements topologiques et la spécificité des ions ont permis de classer ces ATPases de type P en cinq sous-familles, selon Axelsen et Palmgren (1998). Sur 14 arbres phylogénétiques construits à partir des séquences nucléotidiques connues à cette date dans les bases de données, 12 ont été identiques et l'arbre final est présenté dans la figure 12. Les auteurs sont parvenus à affilier ces sous-familles à des fonctions spécifiques comme, par exemple, les ATPases de type P de la sous famille IB, spécifiques des ETM faisant l'objet de cette étude. Depuis cette date, la littérature a apporté de nouveaux éléments et il est connu que ces **ATPases de type P_{IB}** transportent essentiellement les ions métalliques suivant : Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ag⁺ et Cu⁺ (Rensing *et al.*, 1999 ; Argüello, 2003).

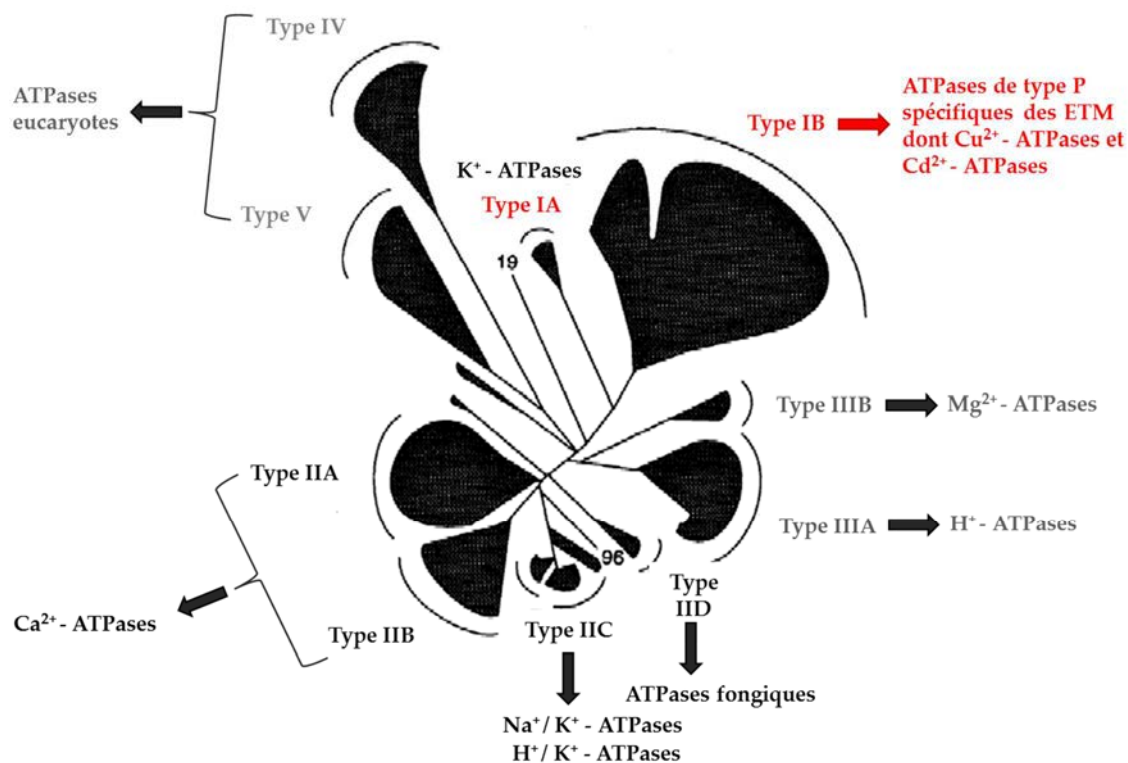


Figure 12 : Arbre phylogénétique des ATPases de type P (adapté de Axelsen et Palmgren, 1998) avec leurs différentes fonctions.

Ces ATPases de type P_{IB} sont présentes dans les trois domaines du vivant (eucaryotes, bactéries et archées) et représentent un des principaux mécanismes permettant la résistance ou la tolérance des microorganismes aux métaux avec la biotransformation (oxydation, réduction, alkylation) et la complexation (immobilisation intra- ou extracellulaire) (Argüello *et al.*, 2007).

Plusieurs sous-groupes d'ATPases de type P_{IB} peuvent être définis en fonction de leur spécificité de substrat comme le montre la figure 13 : le sous-groupe 1 (ATPases-Cu⁺), le sous-groupe 2 (ATPases-Zn²⁺), le sous-groupe 3 (ATPases-Cu²⁺) et le sous-groupe 4 (ATPases-Co²⁺) (Argüello *et al.*, 2007). Cependant, la spécificité n'est généralement pas restreinte à un seul élément : ce système de pompe peut transporter différents substrats. Par exemple, les ATPases du cuivre transportent également l'argent ou encore certaines ATPases du zinc peuvent également transporter le cadmium et le plomb (Argüello *et al.*, 2007).

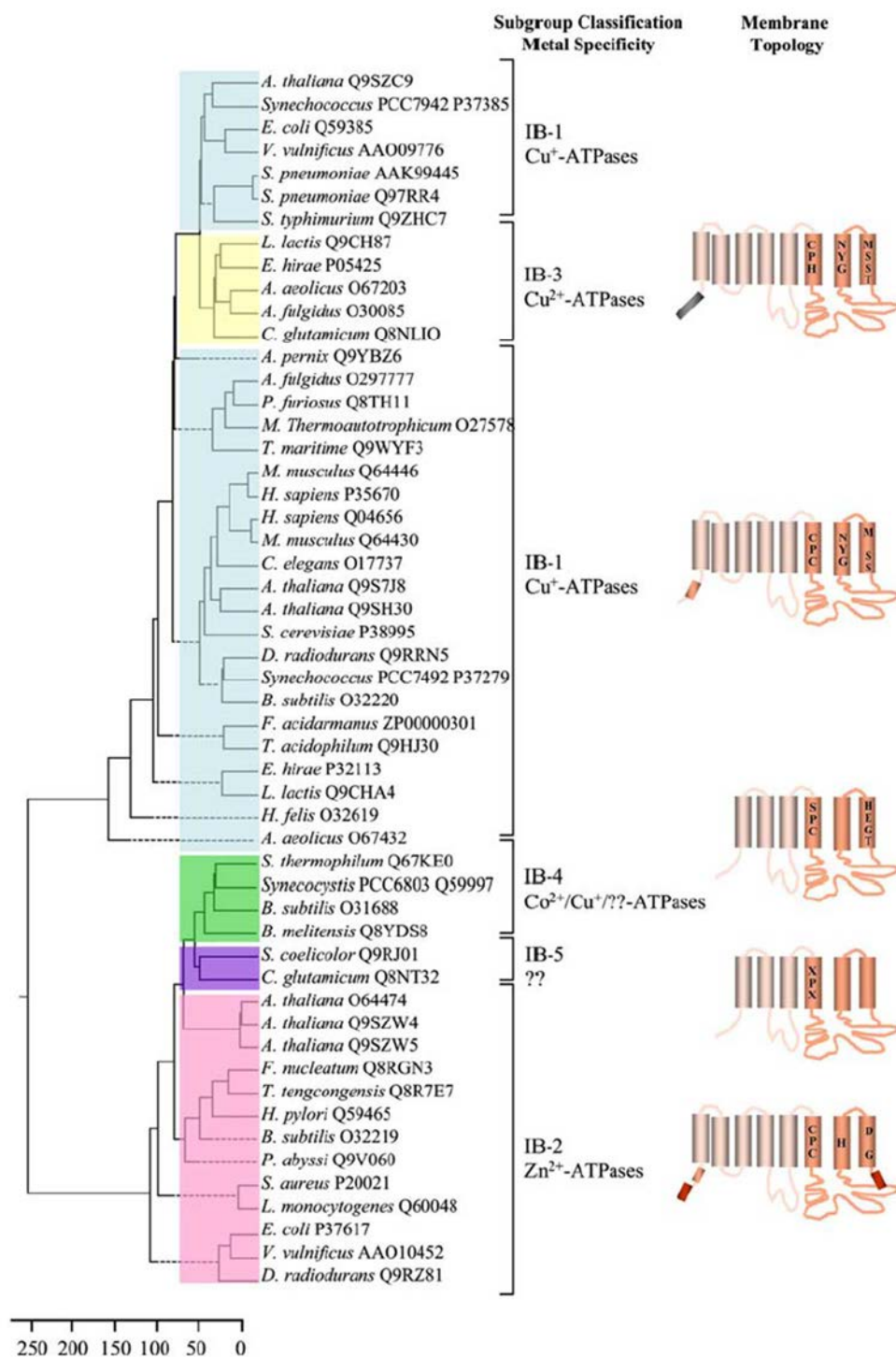


Figure 13 : Arbre phylogénétique des ATPases de type P_{1B} (Argüello et al., 2007). L'arbre a été préparé à partir d'un alignement Clustal W des séquences représentatives des ATPases de type P_{1B}. La spécificité métallique et les caractéristiques structurales sont indiquées à côté du nom des sous-groupes. Les acides aminés proposés dans les domaines transmembranaires déterminent la spécificité métallique. Rectangle noir : MBD (metal binding domain) riche en histidine ; rectangle orange : MBD contenant le motif CXXC ; rectangle rouge : MBD riche en histidine et en cystéine

Les transporteurs métalliques les mieux caractérisés sont ZntA chez *Escherichia coli* (Beard *et al.*, 1997), CadA de *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al.*, 1989) et PbrA de *Ralstonia metallidurans* CH34 (Borremans *et al.*, 2001). La figure 14 schématise les différents mécanismes membranaires connus impliqués dans le transport des ions Zn^{2+} , Cd^{2+} et Pb^{2+} . Sur cette figure sont rassemblées les protéines impliquées dans l'efflux de ces ions mais aussi dans leur absorption. Dans ce dernier cas, le représentant est le système ZnuABC impliqué dans l'import du zinc de manière ATP-dépendante. La protéine ZitB est une pompe d'efflux de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator) et la protéine ZupT appartient à la famille ZIP. Le complexe CzcCBA fera l'objet du paragraphe suivant et la protéine ZntA est donc une ATPase de type P_{IB} .

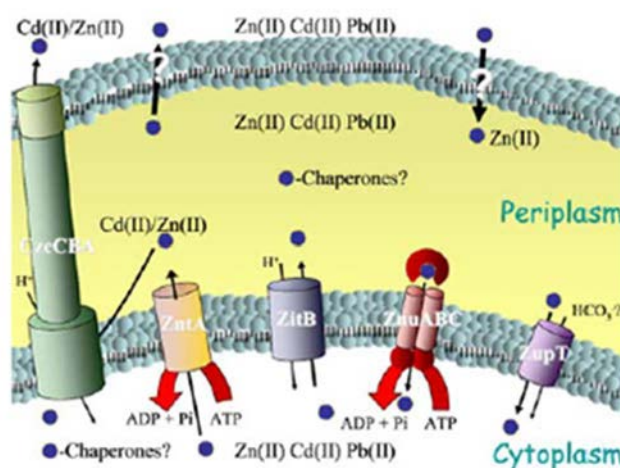


Figure 14 : Mécanismes de l'homéostasie du zinc chez les bactéries à Gram-négatif (Rensing *et Mitra*, 2007).

Les ATPases de type $\text{P}_{\text{IB-2}}$ présentent des motifs structuraux caractéristiques (Figure 15) comme des séquences « Metal-Binding Signature » (MBS) dans leurs segments transmembranaires (6 à 8) et un « Metal-Binding Domain » (MBD) cytoplasmique qui les distinguent des autres ATPases de type P (Argüello *et al.*, 2007). L'analyse des séquences disponibles indique que les ATPases de type P_{IB} ont une séquence peptidique CPC au centre de leur 6^{ème} domaine transmembranaire (H6), avec quelques exceptions contenant la séquence CPH. Alors que la proline est conservée dans toutes les ATPases de type P, le motif CPX apparaît comme un motif spécifique de ces enzymes (Legatzki *et al.*, 2003).

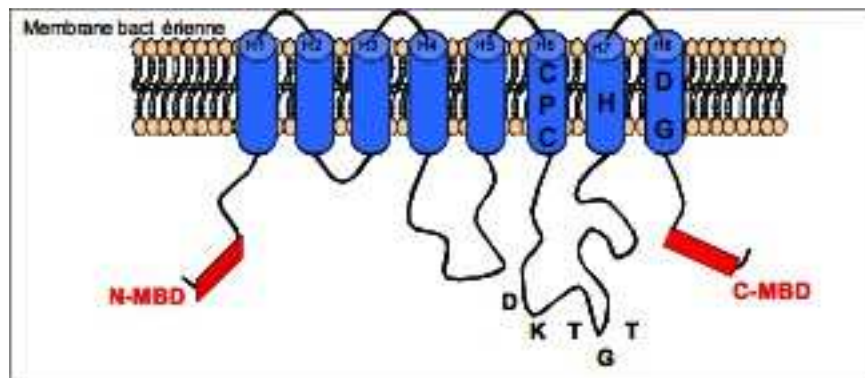


Figure 15 : Principaux domaines structuraux d'une ATPase de type P_{1B-2}

PARTIE III : EVALUATION DE LA (BIO)DISPONIBILITE DES ETM DANS LES SOLS

III.1. NOTIONS DE MOBILITE, BIOACCESSIBILITE ET BIODISPONIBILITE D'UN POLLUANT METALLIQUE

L'accumulation des ETM dans les sols et les sédiments présente des risques potentiels pour les organismes vivants et peut engendrer des perturbations importantes des écosystèmes.

Utilisées avec des significations variées, les notions de mobilité, de biodisponibilité et de bioaccessibilité sont parfois confondues. Aussi, afin d'éviter toute confusion entre ces termes, il nous semble nécessaire de les définir. La **mobilité** est définie comme la capacité d'un élément à migrer d'un point à un autre, à passer d'une forme chimique à une autre ou à changer de phase (passage de la phase solide à la phase liquide principalement) (Juste et Solda, 1988). Le terme de « **biodisponibilité** » peut être défini comme le degré auquel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées par un récepteur humain ou écologique, ou être disponibles pour une interaction avec les systèmes biologiques (Norme EN ISO 17402, 2011). La biodisponibilité peut être interprétée comme un processus dynamiques comprenant trois phases distinctes (RECORD, 2012). Dans le cadre des évaluations des risques pour les écosystèmes, on utilise le plus souvent les phases 1 et 2 décrites ci-dessous :

- **Phase 1 - Disponibilité environnementale** : disponibilité du contaminant dans les sols par des processus physico-chimiques de partition de la substance entre les phases solide et liquide du sol.
- **Phase 2 – Biodisponibilité environnementale** : absorption du contaminant par l'organisme selon des critères physiologiques propres à l'espèce considérée.
- **Phase 3 – Biodisponibilité toxicologique** : Elle correspond à la distribution, l'accumulation et/ou l'effet toxique de contaminant dans l'organisme.

Selon la norme ISO/TS 17924 (2008), la biodisponibilité orale est la fraction de composés ingérée qui est absorbée et qui atteint la circulation systémique. Celle-ci est mesurée par le biais d'expériences *in vivo*, le plus souvent sur des modèles animaux dont le système est proche de celui de l'Homme. La **fraction bioaccessible** est définie comme la fraction d'une

substance dans un sol ou dans une matrice sol, libérée dans les sucs gastro-intestinaux humains et donc disponibles pour l'absorption. Celle-ci est donc mesurée par des méthodes chimiques *in vitro* (Semple *et al.*, 2004).

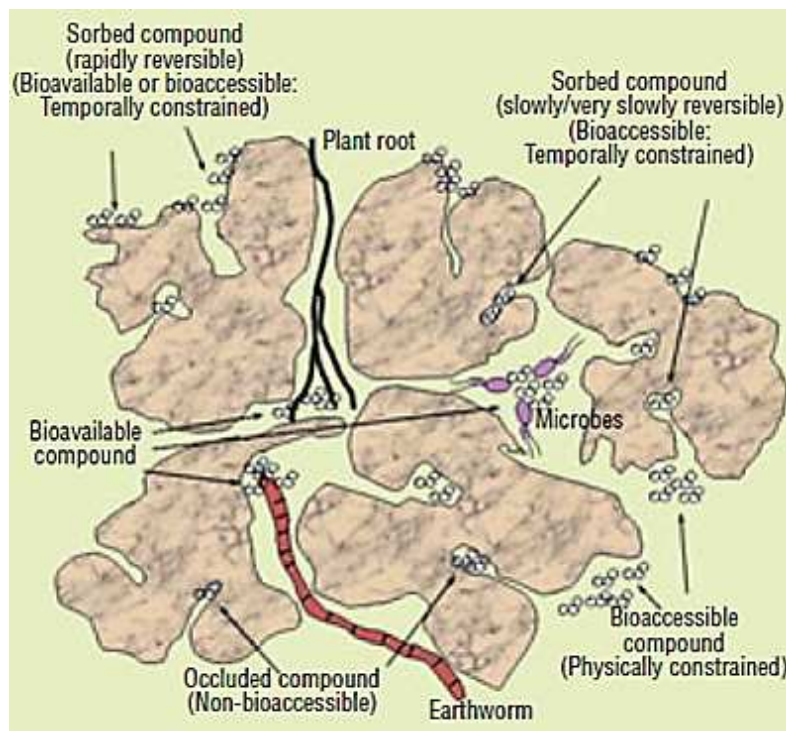


Figure 16 : Fractions biodisponible et bioaccessible d'un contaminant dans le sol définies par sa localisation (Semple *et al.*, 2004).

Pour être biodisponibles et ainsi entrer dans les cellules vivantes, les ETM doivent d'abord être dissous puisque les effets biologiques sont causés par les formes solubles ionisées des métaux et métalloïdes (Rensing *et al.*, 2003). En raison du nombre de facteurs influençant la biodisponibilité des contaminants du sol, la détermination de cette biodisponibilité est compliquée et quelques tests chimiques et biologiques ont été développés et seront décrits dans la suite de cette synthèse bibliographique.

III.1.1 EVALUATION CHIMIQUE DE LA (BIO)DISPONIBILITE

III.1.1.1. Détermination des teneurs totales

La mesure de la concentration totale des ETM dans les sols peut être faite directement sur le solide, par exemple par spectrométrie de fluorescence X mais il est plus fréquent de réaliser une mise en solution suivie d'un dosage de l'élément en phase liquide.

La fusion alcaline permet la dissolution totale des minéraux en utilisant un fondant, comme le tétraborate de dilithium chauffé à une température voisine de 500°C. Le mélange ainsi obtenu est ensuite dissous dans une solution acide. D'autres méthodes sont également utilisées : la mise en solution totale par digestion à chaud du sol à l'aide d'un mélange d'acides fluorhydrique, perchlorique et/ou chlorhydrique ou la mise en solution pseudo-totale par l'utilisation d'eau régale (mélange d'acides chlorhydrique et nitrique) portée à ébullition (Girard *et al.*, 2005).

L'extraction chimique est la mise en solution aqueuse d'une fraction d'un ou plusieurs éléments présents dans la phase solide du sol. On distingue l'extraction simple, pendant laquelle une seule extraction est pratiquée, de l'extraction séquentielle, pendant laquelle plusieurs extractions sont utilisées successivement sur un même aliquote de sol. L'extraction est suivie du dosage de la totalité de l'élément passé en solution au moyen d'une technique adaptée. L'extractabilité peut donc être définie comme étant la faculté d'un polluant métallique à passer en solution. Ainsi nous pouvons citer le test de lixiviation classique, réalisé selon la norme NF 31-210, qui consiste à extraire les éléments étudiés par agitation avec de l'eau en suivant un rapport (mélange sous-produit / eau) d'1/10.

Plus que sa teneur, c'est la forme sous laquelle se trouve l'élément qui est déterminante et c'est l'objet du paragraphe suivant.

III.1.1.2. Spéciation des ETM

Le terme spéciation au sens strict recouvre la distribution des espèces chimiques d'un élément au sein d'un système solide ou liquide. Cette notion a, cependant, été utilisée, ces dernières années, dans une acception beaucoup plus large recouvrant la localisation d'un élément dans les différentes phases solides. La spéciation, définie de cette manière, des ETM fait donc l'objet de ce paragraphe.

Les ETM, dans les sols, peuvent se trouver sous différentes formes : en solution, sous forme dissoute, colloïdale, libre ou complexé, ou sous forme solide ou de précipité, lié à des phases minérales ou organiques. La détermination de la spéciation d'un ETM est donc nécessaire pour discuter de la notion de toxicité, biodisponibilité ou mobilité. C'est pour cette raison que différentes extractions ont été mises au point pour estimer la spéciation d'un ETM. Il est possible d'extraire de façon séquentielle les ETM contenus dans les phases solides des

échantillons de sols et les fractions ainsi obtenues sont définies par rapport au mode opératoire utilisé, à l'extractant et aux conditions d'extraction. Ainsi, il est possible de classer les ETM des sols en fonction du réservoir auquel ils appartiennent et qui conditionne leur mobilité comme le montre la figure 17. Ainsi cinq formes des ETM peuvent être répertoriées et classées en fonction de leur mobilité (Juste, 1995 ; Baize, 1997) :

- (i) la fraction adsorbée et/ou liée aux argiles par exemple, qui témoigne d'une très grande mobilité
- (ii) les fractions incorporées dans les êtres vivants et (iii) complexées à la matière organiques, toutes deux moyennement mobiles
- (iv) la fraction précipitée faiblement mobile et
- (v) la fraction incluse dans les réseaux cristallins des minéraux, quasiment immobile.

La spéciation des ETM peut également être obtenue par fractionnements physiques. Cette approche consiste à localiser, identifier et caractériser les phases porteuses des ETM par des fractionnements granulométriques, densimétriques et/ou magnétiques.

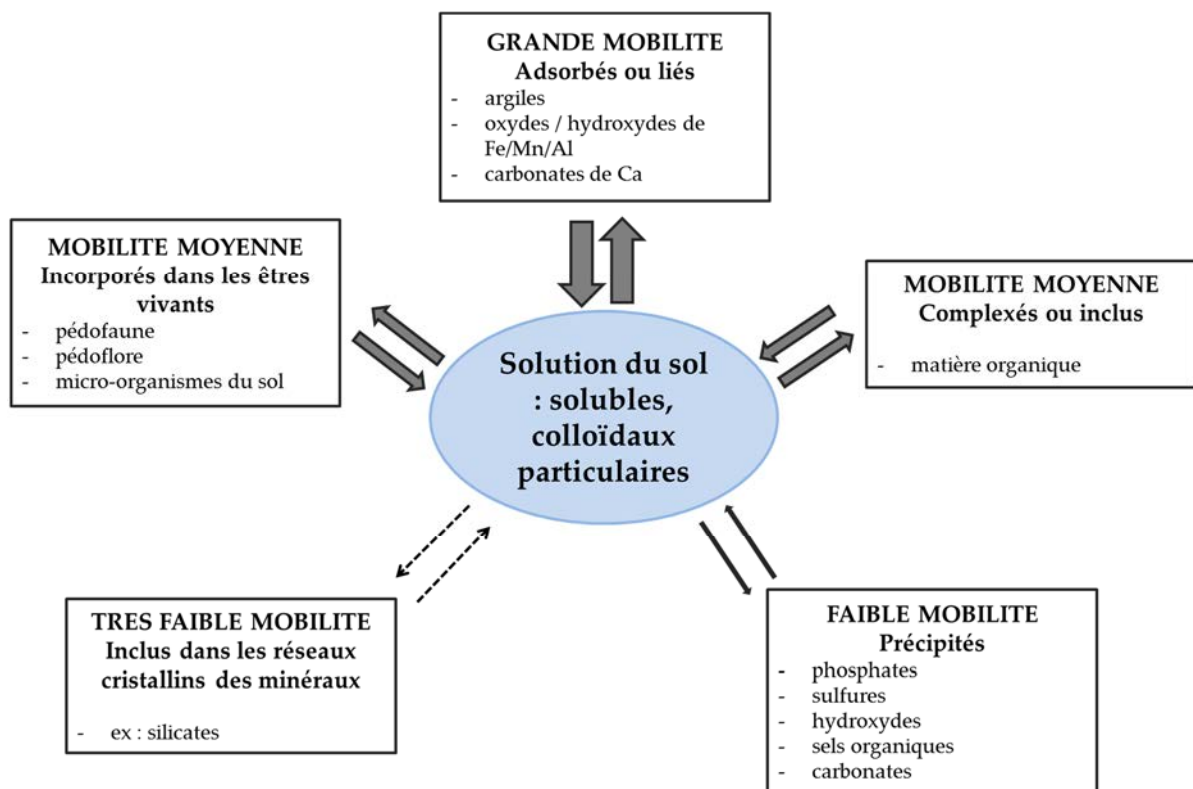


Figure 17 : Différentes formes et localisations des ETM dans les sols (adapté de Juste, 1995 et Baize, 1997).

III.1.1.3. Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des ETM

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.1., derrière la définition de la biodisponibilité se cache un concept difficile à mesurer. La fraction des ETM biodisponible est souvent assimilée à la fraction la plus facilement ou rapidement échangeable avec la solution. Les essais d'évaluation de la biodisponibilité des ETM ont alors été réalisés, en grand nombre, à l'aide de solutions d'acides dilués, de chélatants, d'eau ou de solutions salines non tamponnées. Dans des conditions définies de concentration et de pH, les acides dilués (CH_3COOH , HCl) permettent d'extraire les ETM associés aux carbonates et/ou oxydes par exemple, les complexants organiques (EDTA, DTPA) dissocient les ETM fixés à la matière organique du sol et les solutions salines non tamponnées (CaCl_2 , NaNO_3) sont utilisées afin d'extraire la fraction échangeable (Lebourg *et al.*, 1996). L'utilisation de ces méthodes se heurte à de nombreux problèmes comme la non-maîtrise de processus physico-chimiques de la réaction entre le sol et le réactif, les difficultés à définir les conditions expérimentales et la non-conservation des conditions initiales de l'échantillon notamment en raison des processus d'oxydo-réduction (Trolard *et al.*, 1995).

➤ Pour l'**arsenic**, l'extraction avec différents sels de phosphate comme le phosphate de potassium, semble être la plus efficace pour extraire les formes d'arsenic liées à l'aluminium et au fer (Alam *et al.*, 2001). Ces auteurs avaient pour objectif de développer une méthode respectueuse de l'environnement et peu coûteuse afin d'éliminer l'arsenic d'un sol contaminé. Pour cela, ils ont contaminé un sol forestier avec de l'As(V) qu'ils ont utilisé comme sol témoin. Le phosphate de potassium a permis d'extraire plus de 40% de l'arsenic constitués essentiellement de la fraction échangeable et non de la fraction résiduelle.

➤ L'EDTA et le DTPA sont les composés les plus utilisés pour évaluer la biodisponibilité du **Cd**, **Pb**, **Zn**, Ni et Cu. Pour chacun d'eux, diverses méthodes sont proposées (Beckett, 1989).

En conclusion, il n'existe toujours pas de méthodes d'extraction chimique universelle permettant d'évaluer simultanément et sans difficultés analytiques la biodisponibilité des ETM et ainsi de définir les risques de toxicité qui lui sont directement liés (Lebourg *et al.*, 1996).

Une autre approche, que l'on peut considérer comme une méthode d'évaluation biochimique de la biodisponibilité d'un ETM. Cette approche, se situant entre l'évaluation chimique et l'évaluation biologique, consiste à suivre un modèle de digestion *in vitro*. De nombreuses études *in vitro* ont été menées pour tenter d'évaluer la bioaccessibilité des ETM dans des échantillons de sols, mais les résultats obtenus sont très variables à cause des facteurs complexes ayant une influence sur ce paramètre (Madrid *et al.*, 2008 ; Rasmussen *et al.*, 2008 ; Poggio *et al.*, 2009). Mingot *et al.* (2011) se sont donc focalisés sur 2 méthodes, décrites par la suite, afin de comparer leur efficacité d'évaluation de la fraction bioaccessible de l'arsenic à partir d'échantillons de sols. La bioaccessibilité d'une substance, telle que la définissent les toxicologues, est la fraction qui est soluble dans l'environnement gastro-intestinal et qui est disponible par absorption. Le test SBET (Simplified Bioaccessibility Extraction Test) décrit par Ruby *et al.* (1999) simule un environnement gastrique et le test PBET (Physiologically Based Extraction Test) décrit par Oomen *et al.* (2003) simule un fluide intestinal, en plus de simuler un fluide stomacal. Le bilan de cette étude comparative est qu'une simulation gastrique est suffisante pour se rendre compte, de la manière la plus répétable possible, de la fraction bioaccessible d'un ETM dans un sol.

Il existe aussi les méthodes isotopiques pour étudier la phytodisponibilité qui consistent à suivre, à l'aide de traceurs radioactifs, le devenir des éléments dans les systèmes sol-plante (Echevarria *et al.*, 1996)

III.1.2 EVALUATION BIOLOGIQUE : LES « BIOINDICATEURS »

III.1.2.1. Définitions

D'autres méthodes plus récentes utilisant les paramètres biologiques des organismes vivants, tant à l'échelle du simple individu que des écosystèmes entiers, ont été développées avec comme objectif de mesurer l'impact des contaminants sur les différents organismes, populations et communautés peuplant un milieu donné (Daby, 2006 ; Kaiser, 2001 ; Markert *et al.*, 2003). Ces indicateurs biologiques présentent l'intérêt de renseigner sur l'exposition à l'ensemble des différents contaminants et sont intégrés dans le temps, contrairement aux mesures instrumentales qui ne peuvent offrir qu'une image ponctuelle et statique de la situation (Fränzle, 2003).

Il y a quelques années de cela et encore dans de nombreux ouvrages actuels, le terme « bioindicateur » était employé afin de désigner l'un ou l'autre des différents types d'indicateurs biologiques utilisés dans l'évaluation de la qualité de l'environnement. Néanmoins, l'évolution rapide de cette science a engendré une multiplication et une spécialisation des termes employés dans ce domaine. C'est pour cette raison que nous allons définir ces différents termes pour souligner les nuances existantes entre un bioindicateur, un bioaccumulateur, un biomarqueur et un biosenseur.

∞ Un **bioindicateur** peut être un individu ou un ensemble d'individus qui, par référence à des variables physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre, de refléter l'état d'un écosystème et de mettre en évidence les effets physiologiques affectant ces organismes sous l'influence de conditions environnementales stressantes (Fränzle, 2003).

∞ Un **bioaccumulateur** est un organisme ayant la capacité d'accumuler certains contaminants présents dans l'environnement. Cette bioaccumulation peut dépendre de deux phénomènes : la bioconcentration et l'amplification. La bioconcentration est le transfert direct des substances à partir du milieu ambiant (eau, sédiments, etc.) vers les tissus et les organes (D'Adamo *et al.*, 2008 ; Markert *et al.*, 2003). L'amplification est le résultat du transfert des contaminants le long des différents niveaux de la chaîne alimentaire (D'Adamo *et al.*, 2008 ; Kaiser, 2001).

∞ Un **biomarqueur** est un paramètre biologique observable à un niveau inférieur à celui de l'individu et qui permet d'obtenir des informations quant à l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins un facteur de stress. Il peut s'agir de paramètres enzymatiques, génétiques, moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques etc. (Key *et al.*, 2006 ; Markert *et al.*, 2003). Les changements comportementaux dus à des altérations provoquées par les polluants sur ces paramètres biologiques peuvent être considérés comme un type particulier de biomarqueurs (Kaiser, 2001).

∞ Un **biosenseur**, aussi appelé biocapteur (les deux termes sont traduits en anglais par le terme « biosensor »), est un dispositif analytique comportant un élément de nature biologique ou biomimétique capable de détecter un analyte ou une cible prédéfinie (capteur), ainsi qu'un module de transduction physicochimique qui convertit cette reconnaissance en un signal détectable et mesurable. Les biosenseurs fluorescents constituent des outils de choix

pour la détection non invasive de biomolécules dans des milieux complexes, les échantillons biologiques ainsi que sur des cellules vivantes ou des tissus. Ils permettent la détection de modifications conformationnelles, post-traductionnelles, la mesure d'activités enzymatiques et la quantification d'interactions protéine/protéine.

Initiée il y a environ une vingtaine d'années (King *et al.*, 1990), l'ingénierie des cellules bactériennes, ayant pour objectif de détecter divers signaux, s'est largement développée depuis (Daunert *et al.*, 2000 ; Elad *et al.*, 2008). La figure 18 résume ce concept de biosenseur basée sur une bactérie avec le système-clé des protéines rapporteuses.

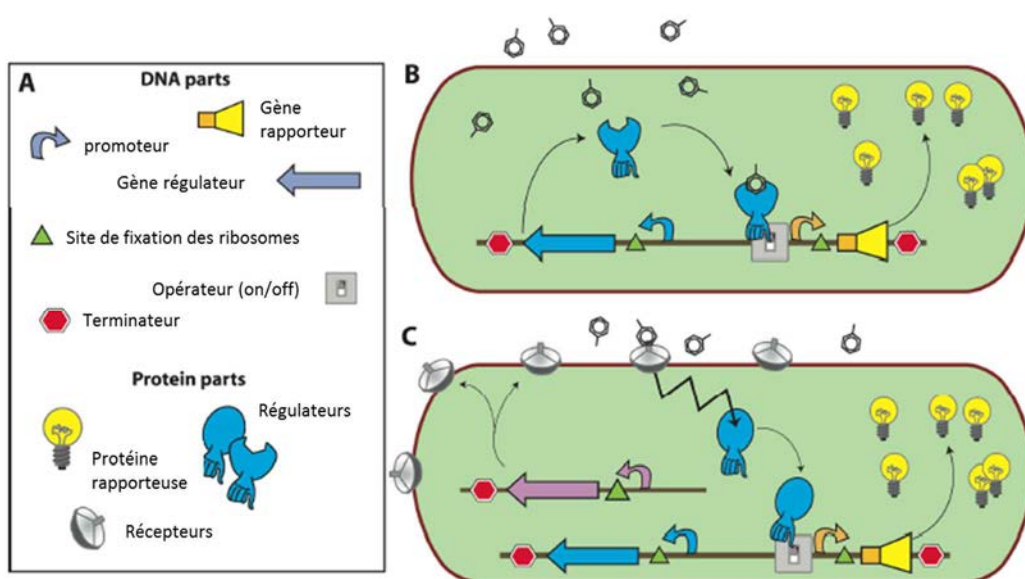


Figure 18 : Concept d'une cellule bactérienne « biosenseur » (adapté de Tecon et van der Meer, 2008). (A) Les gènes régulateur et rapporteur sont nécessaires pour la fonction de senseur et de production protéique du système, respectivement. Les autres parties de l'ADN pour le contrôle de l'expression des gènes. (B) Dans cette configuration, la protéine régulatrice fixe la cible et induit la transcription du gène rapporteur, conduisant à la production des protéines rapporteuses. (C) Un récepteur périplasmique fixe la cible et transmet le signal au régulateur (flèche en zigzag). Le régulateur activé induit ensuite l'expression du gène rapporteur.

III.1.2.2. Applications aux ETM

En 2001, deux plasmides ont été construits dans lesquels les promoteurs *zntA* et *copA* d'*E. coli* ont été fusionnés à l'opéron *luxCDABE* de *Vibrio fischeri* (Riether *et al.*, 2001). Les fusions *zntAp::lux* inductible par le Cd, Pb, Hg et Zn et *copAp::lux* inductible par le Cu et Ag permettent de détecter des concentrations en ETM allant du nanomolaire au micromolaire. Ces biosenseurs permettent donc d'aborder la fraction biodisponible des métaux en conditions contrôlées mais n'ont pas été appliqués à des échantillons environnementaux.

Récemment, en 2012, George *et al.* ont évalué différents kits permettant de screener la pollution en arsenic dans les puits au Bangladesh. La majorité de ces techniques se basent sur des interactions entre l'arsenic et des réactifs chimiques tels les acides tartrique ou sulfonique mais une récente étude utilise des biosenseurs bactériens luminescents (Siegfried *et al.*, 2012) permettant même la détection simultanée de plusieurs ETM (Cd, As, Hg et Cu) (Jouanneau *et al.*, 2012).

Des biotests de toxicité utilisent les végétaux qui, en réponse au stress induit par différentes substances, enclenchent des mécanismes de régulation du métabolisme (préciser) ainsi que des processus de compartimentation de l'élément toxique dans la cellule. Il peut alors en résulter des biotests de toxicité chronique basés sur les capacités enzymatiques (Mench *et al.*, 1996).

III.2. EXPRESSION DE GENES FONCTIONNELS BACTERIENS DANS LES SOLS

L'analyse de l'expression des gènes dans des échantillons environnementaux est une approche pertinente pour évaluer, *in situ*, l'état métabolique des cellules microbiennes physiologiquement actives. En effet, la quantification des ARNm est un bien meilleur indicateur d'une activité métabolique que la mesure du nombre de copies d'un gène dans un échantillon environnemental. Cependant, deux obstacles majeurs limitent la mesure de l'expression des gènes *in situ*. En premier lieu, de nombreuses activités microbiennes importantes au plan écologique peuvent être de faible intensité, ce qui se traduit par de faibles abondances des ARNm correspondant. D'autre part, l'obtention d'ARNm de haute qualité à partir de matrices environnementales complexes comme les sols est encore aujourd'hui techniquement difficile (Baelum *et al.*, 2008 ; Saleh-Lakah *et al.*, 2005 ; Saleh-Lakah *et al.*, 2011).

III.2.1. EXTRACTION DES ARN DU SOL

De nombreuses études montrent que moins de 1% des bactéries présentes dans un gramme de sol sont cultivables (Prosser, 2002 ; Davis *et al.*, 2005).

Les récentes avancées en écologie microbienne moléculaire permettent cependant de caractériser finement la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes des sols sans les cultiver. Il est possible, après extraction et analyse de l'ADN, non seulement d'établir un inventaire des microorganismes présents (analyse des gènes codant les ARNr 16S ou 18S), mais aussi de détecter et quantifier des gènes fonctionnels, comme, par exemple, ceux participant aux biotransformations de l'azote, du soufre ou ceux impliqués dans la dégradation de polluants organiques. Si ces approches permettent d'évaluer les potentialités métaboliques des communautés microbiennes, elles ne fournissent pas d'information sur leur réelle activité *in situ*. Pour cela, l'étude de l'expression de gènes de fonction spécifique *via* la détection et/ou la quantification de leurs transcrits (ARNm) est certainement la méthode la plus prometteuse. Les études décrivant la détection et la quantification d'ARNm de populations indigènes dans les matrices environnementales complexes restent encore peu nombreuses. Ces recherches doivent être encore développées afin de mieux comprendre les fonctions microbiennes dans les sols et les interactions entre les microorganismes et leur environnement (Saleh Lakah *et al.*, 2005 ; 2011).

L'efficacité d'extraction des ARN à partir d'échantillons environnementaux est variable et dépend souvent de la matrice environnementale et de la méthode d'extraction des ARN. L'hétérogénéité du sol d'une part, mais aussi la présence de substances humiques, de matière organique ou de particules d'argiles qui peuvent se lier aux acides nucléiques peuvent ainsi interférer avec les processus d'extraction (England *et al.*, 2001, England et Trevors, 2003 ; Sayler *et al.*, 2001 ; Trevors, 1996). Ainsi, Hurt *et al.* (2001) ont montré, en mesurant les rendements d'extraction d'ARN et d'ADN à partir de 19 sols de compositions et de propriétés physico-chimiques différentes, que le rendement en ARN variait de 1,4 à 56 µg d'ARN par gramme de sol sec avec des écarts-types allant de 0,5 à 17,2 pour une même méthode d'extraction.

Sessitsch *et al.* (2002) ont montré que la méthode d'extraction des ARN affecte non seulement le rendement en ARNm mais aussi la composition de la communauté bactérienne détectée et l'abondance des membres de cette communauté.

La stabilité des ARN après extraction est également un point critique. En effet, les ARN ont des temps de demi-vie très courts et leur stabilité peut être affectée par plusieurs paramètres tels les RNases, leur stockage, leur purification et leur manipulation (Mendum *et al.*, 1998).

➤ Toutes ces difficultés justifient le fait que, durant la dernière décennie, la plupart des études publiées sur des activités transcriptionnelles ont concerné des environnements présentant une faible concentration en inhibiteurs co-extractibles, en radicaux organiques ou en nucléases comme nous pourrions le voir dans la suite.

III.2.2. PRECEDENTES ETUDES DE L'EXPRESSION DES GENES DANS DES SYSTEMES COMPLEXES

Cette synthèse des précédentes études menées sur l'expression de gènes fonctionnels à partir d'échantillons de sol n'est pas exhaustive mais les travaux ayant abouti à une publication ne sont pas nombreux. De plus, ces études transcriptionnelles peuvent être réalisées de plusieurs manières. Par exemple :

- (i) étude transcriptionnelle après inoculation de microorganisme(s), considéré(s) comme modèle(s) pour la fonction étudiée, dans le sol (Bürgmann *et al.* 2003 ; Han and Semrau, 2004 ; Jacobsen et Holben, 2007 ; Nicolaisen *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Shannon *et al.*, 2011).
- (ii) étude transcriptionnelle au sein de la population bactérienne indigène de l'échantillon de sol, de manière non-quantitative ((Nogales *et al.*, 2002 ; Leininger *et al.*, 2006 ; Henderson *et al.*, 2010 ; Baelum *et al.*, 2008), ou de manière quantitative (Monard *et al.*, 2010 ; Freitag et Prosser, 2009).
- (iii) étude avec ou (iv) sans ajout du polluant

La plupart des études sur l'expression des gènes dans le sol ont été réalisées sur les fonctions microbiennes du **cycle de l'azote** incluant la fixation de l'azote et les processus de nitrification-dénitrification. Cependant, l'expression des gènes a aussi été quantifiée chez les pathogènes du sol et les microorganismes utilisés en bioremédiation. Bürgmann *et al.* (2003) ont développé un protocole d'extraction des ARNm du sol et un protocole de RT-PCR pour la détection de l'expression du gène de fixation de l'azote *nifH* chez *Azotobacter vinlandii*. Ils ont conclu que l'expression de ce gène était positivement corrélée avec une activité de fixation de l'azote dans le sol non-rhizosphérique. Henderson *et al.* (2010) ont mesuré une augmentation de l'expression du gène *nosZ*, un gène impliqué dans la dénitrification, en réponse à un ajout

de carbone organique sous la forme de trèfle rouge, de l'orge ou encore de soja dans des microcosmes de sol en condition anoxique. De même, l'effet de paramètres variables tels que le nitrate, le glucose et la température sur l'expression des gènes de dénitrification a été évalué chez *Pseudomonas mandelii* inoculé dans un sol agricole, dans lequel cette bactérie dénitrifiante était dominante (Shannon *et al.*, 2011). Shannon *et al.* (2011) ont mis en culture *Pseudomonas mandelii* jusqu'en phase exponentielle de croissance puis ils l'ont inoculée dans des microcosmes de sol pour s'assurer d'obtenir une population de bactéries dénitrifiantes active comparé aux populations du sol qui peuvent être à des états physiologiques différents et donc être non-sensibles au changement de leur environnement. Ils ont souligné une corrélation entre l'abondance du gène *cnorBp* et les processus de dénitrification mais uniquement dans les sols sans ajout de glucose.

Steunou *et al.* (2006) ont prélevé des tapis bactériens près d'une source chaude de Yellowstone « Octopus spring » et montré, à partir de tapis d'environ 1 cm d'épaisseur, que l'activité nitrégénase dans ces communautés microbiennes était liée à l'expression des gènes *nif* (nitrogen fixation) codant des protéines impliquées dans la fixation de l'azote atmosphérique.

Freitag et Prosser (2009) ont été les premiers à extraire des ARNm du gène *mcrA* (codant la méthyl coenzyme M réductase) impliqué dans les processus de **méthanogénèse** dans des tourbières et à mettre en lien l'expression de ce gène avec la production de méthane. Les tourbières constituent des écosystèmes particuliers, caractérisés par l'accumulation progressive de la tourbe formant donc un sol possédant une très forte teneur en matière organique, peu ou pas décomposée, d'origine végétale. Les propriétés de ces sols sont donc particulièrement préjudiciables à l'extraction d'acides nucléiques de bonne qualité.

De récentes améliorations dans l'extraction des ARNm (Nicolaisen *et al.*, 2008) et dans la détection par PCR en temps réel du gène *tfdA* (Baelum *et al.*, 2008) ont permis l'identification et la quantification de gènes fonctionnels de dégradation des herbicides. En effet, Baelum *et al.* (2008) ont quantifié l'expression du gène fonctionnel *tfdA*, codant une dioxygénase impliquée dans la dégradation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et du MCPA (acide 4-chloro-2-méthylphénoxyacétique), durant le processus de dégradation dans des sols naturels non inoculés mais stimulés par l'ajout de ces acides.

A notre connaissance, les réponses transcriptionnelles des bactéries à **l'arsenic** n'ont pas été étudiées dans le sol mise à part une étude réalisée en 2004. Malasarn *et al.* (2004), à partir

d'une préparation d'As(V) adsorbés à des hydroxydes de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), ont montré que l'expression du gène *arrA*, codant une As(V)-réductase respiratoire, c'est-à-dire le ratio entre le nombre de copies des ARNm *arrA* et le nombre de copies du gène *arrA*, était directement corrélée à l'activité de réduction de l'As(V). Ces auteurs ont mis en évidence cette réduction dans les échantillons incubés avec la souche *Shewanella* ANA-3 mais pas dans les échantillons non inoculés ou inoculés avec une souche ANA-3 Δ *arrA* ce qui suggère que cette réduction n'est pas médiée par *arsC* mais bien par *arrA*. L'expression du gène *arrA* pourrait donc être un biomarqueur pertinent de la réduction de l'As(V).

Les eaux géothermales contiennent souvent des taux élevés d'arsenic et contribuent à la contamination des eaux de surface. En 2009, Hamamura *et al.* ont prélevé des échantillons de sédiments en sortie de canal c'est-à-dire à l'endroit où ces eaux commencent à être oxygénées donc où l'As(III) est oxydé en As(V) (Inskip *et al.*, 2005). Ces auteurs sont parvenus à observer, par RT-PCR non quantitative, l'expression des gènes *aioA*-like dans ces échantillons. De plus, les séquences des cDNA ainsi récupérés étaient cohérentes avec les géotypes identifiés dans les mêmes environnements.

III.2.3. ETUDES METATRANSCRIPTOMIQUES *in situ*

La métagénomique a révolutionné la microbiologie mais la vraie révolution se trouve dans la métatranscriptomique car une étude seule du métagénome ne permet pas de distinguer les gènes activement exprimés c'est-à-dire codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme d'une bactérie ou d'une communauté bactérienne. Les études de métatranscriptomique, quant à elles, sont menées afin de récupérer et séquencer les ARN et elles fournissent une opportunité sans précédent d'explorer les gènes codants chez différents organismes (Simon et Daniel, 2011).

Dans notre cas, la transcriptomique environnementale apporte un ensemble de données, sans avoir une idée préalable des gènes que la communauté pourrait exprimer (Poretsky *et al.*, 2005 ; Frias-Lopez *et al.*, 2008). C'est en partie pour cette raison que cette approche peut fournir une perspective moins biaisée de la diversité et de la fonction d'une communauté *in situ* et offrir une vision plus réaliste de la fonction écologique.

Comme nous l'avons vu précédemment (§ III.2.1.), les protocoles de transcriptomique environnementale sont difficiles puisque les ARNm procaryotes ne possèdent pas de queue poly(A), queue poly(A) rendant l'isolation des messagers eucaryotes simple et ces ARN ont un temps de demi-vie relativement court. C'est, là aussi pour ces raisons, que ces analyses métatranscriptomiques n'ont pas été largement utilisées pour profiler des environnements complexes. A notre connaissance, jusqu'en 2012, ces études se sont focalisées essentiellement sur les systèmes marins et aquatiques (Frias-Lopez *et al.*, 2008 ; Poretsky *et al.*, 2009 ; Shi *et al.*, 2009 ; McCarren *et al.*, 2010 ; Mou *et al.*, 2011) avec peu d'études sur les systèmes « sol » (Stewart *et al.*, 2011 ; de Menezes *et al.*, 2012).

L'objectif des travaux de de Menezes *et al.* (2012) était d'examiner les réponses d'une communauté dans un sol à une contamination au phénanthrène en utilisant une approche de métatranscriptomique. L'intention des auteurs était de décrire les effets directs et indirects qu'avait ce polluant sur l'expression des gènes sans idées préconçues sur les possibles réponses des communautés. L'ARN de microcosmes de sol a donc été extrait puis analysé par pyroséquençage. D'une manière générale, le nombre de transcrits de dioxygénases et de gènes associés aux réponses de stress et à la détoxification augmentent après exposition au phénanthrène (entre 1.8 et 33 fois) alors que les transcrits associés au métabolisme général augmentent moins (entre 0.7 et 1.7 fois). Néanmoins, les auteurs soulignent le fait que la réponse de la communauté est complexe mais ils ont pu mettre en avant de nouveaux mécanismes qui pourront être étudiés plus spécifiquement dans de prochaines études.

PARTIE IV : OBJECTIFS DE LA THESE

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de déterminer dans quelle mesure la diversité et l'abondance des gènes de résistance aux métaux (Cd, Zn et Pb) et aux métalloïdes (As, Sb) et de leurs transcrits constituent des marqueurs pertinents des concentrations biodisponibles en ETM dans les sols.

Pour atteindre ces objectifs, ce travail de thèse a tout d'abord consisté à mettre en place un outil moléculaire permettant de quantifier l'abondance des gènes fonctionnels de résistance à l'arsenic, *arsB* et *ACR3*, par PCR en temps réel (**Chap. III – Partie I**). Le développement d'une méthode robuste d'extraction des ARNm permettrait d'évaluer, au sein des communautés bactériennes, la dynamique transcriptionnelle de ces gènes ainsi que du gène *aioA* codant l'As(III)-oxydase. Dans cette première partie, l'occurrence des gènes codant des systèmes d'efflux telles que les ATPases de type P_r, ayant pour fonction d'exporter le Cd, le Zn et le Pb, a été abordée à travers le développement d'amorces ciblant ces gènes parmi un pool génomique provenant de sols pollués par ces ETM (**Chap. III - Partie II**). La vérification des méthodes d'extraction des ARNm et de RT-PCR en temps réel est passée ensuite par la quantification de l'abondance et de l'expression de ces trois gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans des enrichissements liquides en fonction d'un gradient de concentrations en As(III) (**Chap. III - Partie III**) puis dans des microcosmes de sable en présence d'As(V), d'As(III) et d'un mélange de ces deux formes inorganiques d'arsenic (**Chap. III - Partie IV**). Dans la suite de ce travail, les expériences ont été réalisées pour se rapprocher des conditions environnementales, en complexifiant la matrice expérimentale : ainsi, l'impact d'une contamination arsénée et son éventuelle corrélation avec l'abondance de ces gènes ont été observés sur le long terme dans des terres provenant d'un sol de cokerie multi-contaminé de Neuves-Maisons. Cette partie du projet présentait un double objectif, le second étant d'étudier l'effet de la végétation et d'un traitement de désorption thermique sur les communautés bactériennes résistantes à l'arsenic dans ces terres (**Chap III - Partie V**). Finalement, le sol d'Auzon a été utilisé et a permis d'appréhender l'effet d'une très forte pollution arsénée sur ces communautés bactériennes par une expérience en microcosmes de sol et de conclure sur leur rôle en tant que bioindicateur de la biodisponibilité de l'arsenic et de l'antimoine, dès lors que la

biodisponibilité peut être considérée comme étant corrélée à la mobilité et à la fraction échangeable (**Chap. III - Partie VI**).

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

I. SITES D'ETUDE

Les sites d'étude ont été choisis en fonction de leurs pollutions respectives. Les travaux présentés dans ce manuscrit sont appliqués sur le site d'Auzon, friche industrielle dont les sols sont majoritairement contaminés par des résidus arséniés et sur les terres de Neuves-maisons, provenant aussi d'une friche industrielle multi-polluée, quant à elle, aux HAP et aux ETM.

I.1. SITE D'AUZON (PARCELLE 227)

I.1.1. CARACTERISTIQUES DU SITE

Le site d'Auzon se trouve en Auvergne dans le département de la Haute Loire (43). Nous nous intéressons plus particulièrement à la parcelle 227, qui est située au sud-ouest de la friche industrielle dite de la « vieille usine », inscrite au répertoire des sites pollués référencés en 1996 par le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. Ce site se trouve sur une plate-forme alluviale proche de la confluence entre les rivières Auzon et Allier et son sol est essentiellement pollué à l'arsenic, ce qui constitue un véritable danger pour l'environnement.

Durant la première moitié du XX^{ème} siècle, c'est-à-dire de 1902 à 1949, cette usine a fabriqué de nombreux produits arséniés tels que de l'acide arsénieux (6212 t), de l'arsenic blanc (462 t) ou encore de l'arsenic métal (35 t) (Vialaron, 1998) qui étaient destinés à produire des arsénates de plomb, de calcium et de sodium entres autres, principaux constituants des pesticides.

Différents travaux ont déjà été conduits sur ce site, en particulier par l'ANRED (Laffite 1985, 1986), le BRGM (Turland 1985 et Mossmann 2000) et le CNRSSP (Matera 1998 et 2001 ; Laperche et Eisenlohr, 2001). Tous ces travaux mettent en évidence une pollution du site en arsenic au niveau des sols (jusqu'à 1%), des eaux de la nappe (jusqu'à 7315 µg/L) et de la rivière Auzonb (jusqu'à 97 µg/L).

De nombreux prélèvements, réalisés par le BRGM, ont permis de réaliser des cartographies de pollution du sol en arsenic à différentes profondeurs (Laperche et Eisenlohr, 2001). La figure 19 représente l'une d'entre elles, réalisée à partir de prélèvements en surface de 0 à -20 cm.



Figure 19 : Représentation cartographique avec une maille de 10 mètres des concentrations en arsenic (mg As/kg sol sec) pour des prélèvements en surface de 0 à -20 cm. Les points verts représentent les concentrations en arsenic (Laperche et Eisenlohr, 2001). Les lettres A, C et D indiquent les zones de prélèvements.

I.1.2. ECHANTILLONNAGE, PREPARATION ET CARACTERISTIQUES DES ECHANTILLONS DE SOLS

Dix échantillons de sol, répertoriés dans le tableau – Annexe 2, ont été prélevés le 25 nov. 2011 dans les 3 zones A, C et D, schématisées sur la figure 19.

Les échantillons ont été prélevés à l'aide d'une pelle en surface, c'est-à-dire de 0 à -20 cm. Les mottes ont ensuite été réduites puis le sol a été tamisé à 2 mm. Les valeurs en arsenic total de ces dix échantillons de sol, mesurées par fluorescence X à l'aide d'un analyseur portable NITON, ont été obtenues après avoir fait la moyenne des valeurs obtenues aux 4 coins et au centre de l'échantillon tamisé (Tableau – Annexe 2). Des aliquotes de sol (environ 80 g) ont été déposées dans des tubes Falcon de 50 ml. Pour chaque échantillon de sol, une aliquote a été stockée à -20°C pour les futures extractions et analyses de l'ADN et une autre a été stockée à -80°C pour les extractions et analyses de l'ARN. Le reste des échantillons a été stocké en chambre froide à 4°C. Les concentrations des différents ETM, mesurées également par fluorescence X, dans les échantillons de sol utilisés dans cette étude sont répertoriées dans le tableau 2.

Numéro de l'échantillon de sol (zone de prélèvement)	Concentration en ETM total ($\mu\text{g} / \text{g}$)									
	As	Pb	Sb	Zn	Cu	Fe	Mn	Zr	Sr	Rb
2 (C)	354 $\pm$ 33	124 $\pm$ 23	Nd	109 $\pm$ 29	Nd	28099 $\pm$ 761	427 $\pm$ 136	188 $\pm$ 13	107 $\pm$ 10	114 $\pm$ 12
4 (C)	180 $\pm$ 25	74 $\pm$ 19	Nd	92 $\pm$ 29	Nd	29158 $\pm$ 793	605 $\pm$ 157	207 $\pm$ 14	105 $\pm$ 10	138 $\pm$ 14
6 (A)	4138 $\pm$ 419	2205 $\pm$ 200	844 $\pm$ 55	173 $\pm$ 14	130 $\pm$ 19	31822 $\pm$ 1137	601 $\pm$ 98	73 $\pm$ 3	100 $\pm$ 10	116 $\pm$ 3
9 (D)	9762 $\pm$ 155	8170 $\pm$ 311	4519 $\pm$ 114	186 $\pm$ 11	628 $\pm$ 7	51205 $\pm$ 1640	621 $\pm$ 87	103 $\pm$ 22	97 $\pm$ 9	158 $\pm$ 11
10 (D)	745 $\pm$ 32	514 $\pm$ 53	226 $\pm$ 18	120 $\pm$ 16	Nd	28057 $\pm$ 1470	638 $\pm$ 88	151 $\pm$ 23	91 $\pm$ 4	107 $\pm$ 8

Tableau 2 : Concentrations en ETM totaux dosées par le NITON sur les échantillons de sol 2, 4, 6, 9 et 10 tamisés à 2 mm. Les ETM suivants n'ont pas été détectés : Hg, Mo, U, Th, Se, Au, W, Co, Ni, Cd, Cs, Te, Sn, Ag et Pd

I.2. TERRES DE NEUVES-MAISONS

I.2.1. ORIGINE ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

DES TERRES

Le sol de friche industrielle (sol NM), est un sol sablo-limoneux, de pH 7 avec 12 % de matière organique, pollué aux HAP (1200 mg.kg⁻¹) et ETM (Zn, Cd, Pb, As) (Tableau 3), qui provient de la friche de l'ancienne cokerie-acierie de Neuves-Maisons (Meurthe-et-Moselle, France) (Norini, 2007). Le sol TD est le même sol (Tableau 3), qui a été soumis à un traitement par désorption thermique (Entreprise Deep Green, Bruxelles, Belgique). Ce procédé de dépollution consiste à amener le sol à une température comprise entre 400 et 600°C, entraînant la volatilisation des polluants organiques comme les HAP. Les gaz contenant ces polluants sont récupérés et les polluants sont éliminés par combustion. Le sol a ensuite été refroidi avec de l'eau de rivière (Moselle). En septembre 2005, un dispositif de parcelles expérimentales de longue durée a été mis en place avec ces deux types de terre.

	Sol NM-MSm		Sol TD-MSm	
Date échantillonnage	T0	T9	T0	T9
Granulométrie (g.kg⁻¹)				
Argile (<2 mm)	126		121	
Limons fins (2-20 mm)	164		100	
Limons grossiers (20-50 mm)	97		100	
Sables fins (50-200 mm)	120		161	
Sables grossiers (200-2000 mm)	493		518	
Paramètres agronomiques				
pH	7,0 ± 0,2	7,5 ± 0,1	8,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1
Carbone organique (g.kg ⁻¹)	62,0 ± 3,6	67,9 ± 5,3	58,4 ± 8,3	64,1 ± 4,7
Azote total (g.kg ⁻¹)	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
C:N	23,0 ± 1,3	25,4 ± 2,1	62,0 ± 1,4	52,3 ± 1,4
Soufre (g.kg ⁻¹)	nd	49425 ± 6702	nd	28975 ± 6089
Calcium (g.kg ⁻¹)	41,7 ± 3,4	41,4 ± 3,1	27,1 ± 1,1	25,1 ± 1,2
Eléments en traces métalliques (mg.kg⁻¹)				
Arsenic (As)	48,5 ± 6,6	59,9 ± 14,1	79,5 ± 7,6	88,8 ± 0,9
	(temps T2)	(temps T2)	(temps T10)	(temps T10)
Cadmium (Cd)	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Chrome(Cr)	599 ± 64	1077 ± 151	593,7 ± 23,1	576 ± 87
Cuivre (Cu)	130,8 ± 8,2	136,2 ± 7,2	109,2 ± 1,7	120,2 ± 5,9
Molybdene (Mo)	11,2 ± 0,5	11,0 ± 0,8	11,8 ± 0,3	11,8 ± 0,4
Nickel (Ni)	97,3 ± 4,1	101,6 ± 5,8	102,2 ± 2,1	111,0 ± 5,6
Plomb (Pb)	481,9 ± 57,6	596,6 ± 127,7	672,7 ± 23,0	811,8 ± 38,7
Zinc (Zn)	2085 ± 229	2279 ± 182	2745 ± 26	2915 ± 97
HAP (mg.kg ⁻¹)	1924 ± 258	1205 ± 295	106 ± 4	34 ± 4,4

Tableau 3 : Caractéristiques des sols NM-MSm et TD-MSm aux prélèvements T0 (sept. 2005) et T9 (mai 2010)

I.2.2. PARCELLES LYSIMETRIQUES

Ce dispositif expérimental (décrit par Ouvrard *et al.* (2011)) a été mis en place dans le cadre du GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles : www.gisfi.fr) et d'un projet de recherche financé par les programmes EC2CO et ANR-CES (MULTIPOLSITE) sur la plate-forme expérimentale du GISFI à Homécourt, en Meurthe-et-Moselle (France ; figure 20).



Figure 20 : Photo de la station expérimentale à Homécourt (Meurthe-et-Moselle, France)

Sur ce site se trouvent 24 parcelles lysimétriques schématisées dans la figure 21, qui sont des cuves en acier de 6 m² de surface et de 0,4 m de profondeur dans lesquelles le sol tamisé (40 mm) a été déposé. 20 d'entre elles ont été remplies avec le sol NM et les 4 autres avec le sol TD. Cette étude est centrée sur 16 parcelles correspondant aux 4 modalités suivantes :

- **NM-TN** (terre nue): sol NM, élimination de toute végétation à la main
- **NM-VS** (végétation spontanée) : sol NM, laissé libre à la colonisation végétale
- **NM-Msm** (*Medicago sativa* / mycorhizé) : sol NM, planté avec la luzerne et inoculé avec des champignons mycorhiziens.
- **TD-Msm** (*Medicago sativa* / mycorhizé) : sol TD, planté avec la luzerne et inoculé avec des champignons mycorhiziens.

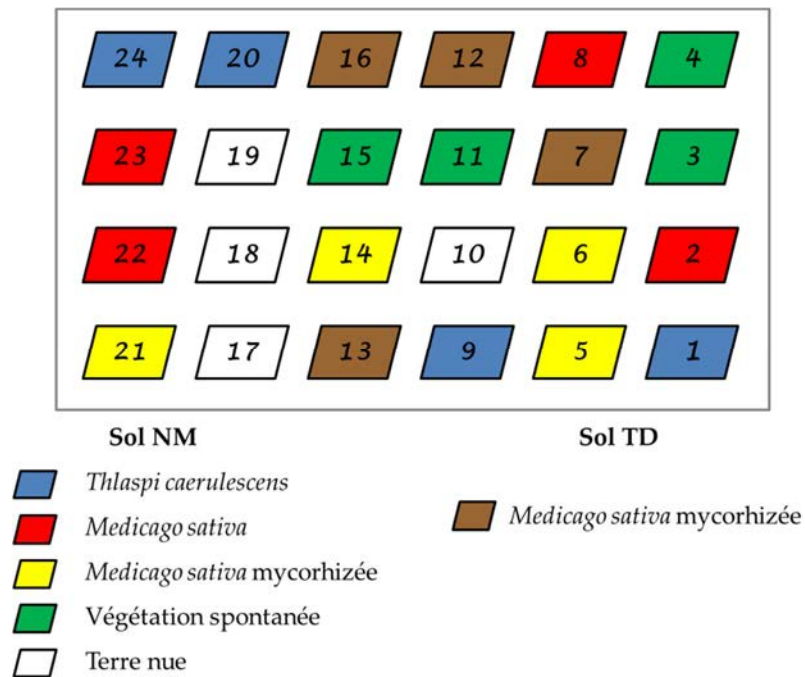


Figure 21 : Schéma des parcelles lysimétriques

I.2.3. ECHANTILLONNAGE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

DE TERRES

Depuis 2006, des échantillons de ce sol ont été prélevés et sont analysés deux fois par an, en mai (printemps) et en septembre (automne) dans le cadre du projet ANR MULTIPOLSITE coordonné par C. Leyval. Au cours de chaque prélèvement, un échantillon moyen de sol d'environ 2 kg est récupéré sur chaque parcelle. Cet échantillon moyen est constitué de 6 prélèvements de terre, à la tarière sur 30 cm de profondeur, par parcelle. Il est ensuite tamisé à 5 mm et un tube Falcon est rempli de ce sol et stocké à -20°C pour les futures extractions d'ADN. Ces échantillons ont été utilisés dans le cadre de cette thèse pour analyser les gènes de résistance à l'arsenic. Des analyses d'arsenic total dans les échantillons ont été réalisées dans le cadre du projet MULTIPOLSITE depuis 2005. Les quantités d'arsenic total varient, au cours du temps et entre parcelles, entre 15 et 80 mg.kg⁻¹.

II. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

Cette section du chapitre « Matériels et Méthodes » décrit les différentes expériences menées au cours de ces travaux de thèse. Dans un premier temps, l'abondance et l'expression des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* ont été étudiées dans des systèmes simplifiés tels que des cultures d'enrichissement en présence des ETM d'intérêt (As et Sb). Progressivement, les dispositifs expérimentaux ont été mis en place dans le but de complexifier les systèmes d'étude comme par exemple l'expérience en batch dans du sable et, pour finir, les microcosmes de sols provenant du site essentiellement pollué à l'arsenic (Auzon). Cette dernière expérience permet ainsi de se rapprocher des conditions environnementales.

II.1. CULTURE EN MILIEU LIQUIDE

II.1.1. EXTRACTION DES BACTERIES DU SOL PAR GRADIENT DE DENSITE (Courtois *et al.*, 2001)

Les échantillons de sol de Neuves-Maisons, tamisés à 2 mm ont été mis en suspension dans 30 ml de tampon salin (0,85 % NaCl) avec 10 g de billes de 2 mm de diamètre, puis homogénéisés par agitation à température ambiante, pendant une heure. Ensuite, les tubes sont immobilisés afin que les grosses particules sédimentent. Un volume de 10 ml de solution « Nycodenz », d'une densité de 1,3 g / ml (8 g de Nycodenz dans 10 ml d'eau ultrapure), est placé précautionneusement sous 20 ml de suspension de sol dans un tube à centrifuger de 50 ml en polycarbonate (Nalgene). Une centrifugation (Beckman JS 7,5) à 7500 rpm pendant 1h à 10°C permet de séparer les bactéries des particules de sol. Les cellules bactériennes, flottant au sommet de la solution de Nycodenz, sont récupérées avec une pipette. Le Nycodenz est éliminé par dilution de la suspension dans du tampon salin (0,85 % NaCl) avant une centrifugation à 4000 g pendant 20 min. Le culot bactérien est suspendu dans 10 ml de tampon salin. La densité de cellules dans la suspension est déterminée directement par comptage au microscope à l'aide d'une cellule de Thoma.

II.1.2. CULTURES D'ENRICHISSEMENT EN PRESENCE D'ARSENIC

II.1.2.1. Dans un milieu nutritif

Les bactéries extraites par gradient de Nycodenz (décrit dans ce chapitre § 1.1) à partir de quatre fois 5g du sol de Neuves-Maisons ont étéensemencées à raison de $1,3 \times 10^5$ bactéries / ml dans 30 ml de milieu nutritif Luria Bertani (LB : Bactotryptone 10 g/l, Yeast Extract 5 g/l, NaCl 10 g/l) en présence de 0,66 mM d'arsénite de sodium (AsNaO_2), de 12,5 mM d'arséniate de sodium ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et d'un mélange de ces deux formes à ces concentrations. Ces tubes de 50 ml ont été incubés à 24°C, à l'obscurité, et sous une agitation de 150 rpm. Les prélèvements ont été effectués après 2 jours, 4 jours et 7 jours d'incubation. Un suivi de la croissance par mesure de la DO à 600 nm a été réalisé pour chacun de ces temps.

II.1.2.2. Dans un milieu minimum

Les bactéries extraites par gradient de Nycodenz (décrit dans ce chapitre § 1.1) à partir de 6 fois 10g du sol de Neuves-Maisons ont étéensemencées dans des erlenmeyers stériles de 250 ml à raison d'environ $5,9 \times 10^5$ bactéries / ml dans 35 ml de milieu Bushnell Haas (MgSO_4 0,2 g, CaCl_2 0,02 g, KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, NH_4NO_3 1 g, FeCl_3 0,05 g) contenant 0,4 % de glucose et $150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de l'anti-fongique cycloheximide additionné ou non de 10 μM , 100 μM , 1 mM ou 10 mM d'arsénite de sodium (AsNaO_2). Les erlenmeyers ont été incubés à 24°C, à l'obscurité, et sous une agitation de 150 rpm. Les prélèvements ont été effectués après 2 j, 3 j, 5 j, et 7 j d'incubation. Cette expérience a été réalisée avec trois réplicats. Un suivi de la croissance par mesure de la DO à 600 nm a été réalisé pour chacun de ces temps ainsi qu'un dosage de l'As(V) par chromatographie ionique et de l'arsenic total par ICP-OES.

II.2. INCUBATIONS DANS DU SABLE STERILE

L'extraction des bactéries par Nycodenz a été faite comme décrit dans le point II.1.1. de ce chapitre, afin d'obtenir dans 6 ml de suspension saline, une concentration voisine de 10^8 bactéries/ml. Du sable de quartz stérile (120 g, tamisé à 2 mm) a été placé dans des flacons de 250 ml. Les bactéries ont été inoculées à raison de $1,67 \cdot 10^5$ bactéries/g de sable en présence :

- d'exsudats racinaires artificiels
- d'exsudats racinaires artificiels et de phénanthrène

- d'exsudats racinaires artificiels et d'arsenic (0,66 mM d'arsénite de sodium AsNaO_2 et 12,5 mM d'arséniate de sodium $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Un témoin sans source de carbone a également été suivi. L'ensemble de ces conditions a été réalisé en trois réplicats. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Aurélie Cébron du LIMOS donc les conditions avec le phénanthrène ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Les exsudats racinaires artificiels (ERA) ont été préparés selon Griffiths *et al.* (1999) et ils contiennent du fructose (20 mM), glucose (20 mM), sucrose (20 mM), succinate (10 mM), malate (10 mM), arginine (5 mM), serine (5 mM), et cystéine (5 mM). La quantité de carbone apportée dans chacun des flacons, mélangée au milieu BH (§ II.1.2.2.), correspond à 1.16 g C.kg⁻¹ de sable. Le volume de solution d'ERA et d'ERA + As était de 18,72 ml afin d'atteindre 80 % de la capacité de rétention en eau du sable.

Les flacons ont été scellés hermétiquement, placés à 24°C à l'obscurité et les échantillons bactériens ont été récupérés au bout de 6 jours.

II.3. MICROCOSMES DE SOLS

II.3.1. SANS SOURCE DE CARBONE

Des échantillons de 25 g des sols 4, 6, 9 et 10 du site d'Auzon (Chapitre I.I du M&M - tableau 2) à 80% d'humidité ont été placés dans des flacons en verre stériles de 250 ml (avec bouchon) puis incubés à 24°C pendant 48 h et à l'obscurité. Les prélèvements ont été effectués après 48 h. Cette expérience a été réalisée avec trois réplicats par traitement. C'est une expérience indépendante de l'expérience décrite dans le paragraphe suivant.

II.3.2. AVEC SOURCE DE CARBONE

Des échantillons de 25 g des sols 2 et 9 du site d'Auzon à 80% de leurs capacités de rétention en eau ont été placés dans des flacons en verre stériles de 250 ml (avec bouchon). Dans une première modalité, les échantillons de sol ont été additionnés d'une source de carbone (citrate $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,5 mg C/g de sol sec) et d'azote (nitrate d'ammonium NH_4NO_3 , 0,04 mg N/g de sol sec) afin de stimuler l'activité de la communauté microbienne.

Une seconde série de microcosmes de sols sans ajout de carbone ni d'azote a été préparée.

Les microcosmes de sols (réalisés avec trois réplicats) ont été incubés à 24°C pendant 15 jours, à l'obscurité et ils ont été sacrifiés donc récupérés après 1 jour, 2 jours, 4 jours et 12 jours. La libération du CO₂ a été mesurée chaque jour (BINOS 1004 Gas Analyser) et après chaque mesure, les flacons ont été aérés 10 min sous hotte.

III. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES ECHANTILLONS DE SOLS

Les analyses physico-chimiques décrites ci-dessous ont été réalisées sur les échantillons des sols provenant du site d'Auzon. Sur les terres de Neuves-Maisons, seules les analyses d'arsenic disponible ont été réalisées dans le cadre de cette thèse car des analyses ont été faites par ailleurs dans l'ANR Multipolsite.

III.1. DETERMINATION DE L'HUMIDITE RESIDUELLE

L'humidité des échantillons de sols a été déterminée sur les échantillons bruts c'est-à-dire les échantillons dont l'humidité est celle de leur lieu de prélèvement. Les échantillons ont été séchés à l'étuve à 60°C pendant environ 40 h jusqu'à masse constante. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial.

III.2. DETERMINATION DU POURCENTAGE DE MATIERE ORGANIQUE

Le pourcentage de matière organique totale est obtenu après calcination dans un four porté à 1000°C pendant 1 heure. La perte de masse observée est attribuée à la matière organique. Le poids de la matière organique est obtenu par différence entre le poids total et le poids des cendres.

III.3. ANALYSE DE L'ARSENIC TOTAL DANS LES ECHANTILLONS DE SOL

Les échantillons de sol ont été broyés, mélangés et homogénéisés par le vibro-broyeur MM200 (Retsch) à une fréquence de 25 Hz soit 1500 tr/min pendant 1 min. 300 mg de sol ont ensuite

été dissous dans le fondant métaborate (25%)/ tétraborate (75%) de lithium par chauffage à 1000°C. La solution a été mélangée à de l'eau acidifiée (10% d'acide nitrique HNO₃) puis ajustée à 100 ml. L'arsenic total présent dans cette solution a ensuite été dosé par ICP-OES.

III.4. MESURE DU PH

Le pH a été mesuré selon la norme ISO 10 390 (Afnor, 1994) à partir de 20 g de sol sec dans un bécher, dilués selon un ratio 1 : 2,5 (m/v) dans de l'eau déminéralisée. La suspension de sol ainsi obtenue a été agitée pendant 1 min avec une baguette de verre. Après avoir laissé reposer pendant 2h, la mesure du pH a été réalisée dans le liquide surnageant.

III.5. DOSAGE DU GLUCOSE

La concentration en glucose a été déterminée par un test colorimétrique (Glucose GOD-PAP, BioLabo) suivant les instructions du fournisseur. Ce test applique la méthode de Trinder (Trinder, 1969 ; Farrance, 1987) : le glucose est oxydé par la glucose-oxydase (GOD) en acide gluconique. Cet acide gluconique réagit avec le chloro-4-phénol et 4-amino-antipyrine (PAP) pour former une quinonéimine rouge, en présence de peroxydase. La quantité de cette quinonéimine (proportionnelle à la quantité de glucose) est évaluée par absorbance à 505 nm au spectrophotomètre (Xenius XML, SAFAS).

III.6. EXTRACTION DE L'ARSENIC DISPONIBLE

III.6.1. EXTRACTION A L'EAU (NORME NFX 31-210)

Une solution d'eau ultrapure (20 ml) est ajoutée à 2 g de sol. La suspension de sol ainsi obtenue est agitée pendant 12 h à température ambiante puis centrifugée à 4000 g pendant 10 min afin de séparer les grosses particules de sol. Le surnageant est filtré à 0,45 µm puis analysé par ICP-OES afin de déterminer la fraction d'arsenic passée en solution.

III.6.2. EXTRACTION AU PHOSPHATE DE POTASSIUM (Alam *et al.*, 2001)

Une solution de phosphate de potassium KH₂PO₄ / K₂HPO₄ (1 : 1) à 400 mM (50 ml) amenée à pH 6 par ajout d'acide ortho-phosphorique (H₃PO₄) est ajoutée à 2 g de sol. La suspension de

sol ainsi obtenue est agitée pendant 7 h à une température de 28°C puis centrifugée à 4000 g pendant 10 min afin de séparer les grosses particules de sol. Le surnageant est filtré à 0,45 µm puis analysé par ICP-OES afin de déterminer la fraction d'arsenic passée en solution.

III.7. ICP-OES ET CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

L'arsenic total a été quantifié par ICP-OES et l'arséniate a été dosée par chromatographie ionique. Les quantités d'arsénite ont donc été estimées en retirant la quantité d'arséniate présente dans les échantillons à la quantité d'arsenic total.

IV. ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

IV.1. REPERTOIRE DES BACTERIES ET DES PLASMIDES

L'ensemble des bactéries et plasmides utilisés dans ce travail sont répertoriés dans le tableau 4.

Souches bactériennes et plasmides		Caractéristique ou génotype	Source ou référence
<i>Escherichia coli</i>	TOP 10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZM15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL$ (Str ^r) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
	JW3434	Souche délétée pour le gène <i>zntA</i> (Km ^r)	Baba <i>et al.</i> , 2006
	JW3469	Souche délétée pour le gène <i>arsB</i> (Km ^r)	Baba <i>et al.</i> , 2006
	DW3110	Souche délétée pour le gène <i>copA</i> (Km ^r)	Rensing <i>et al.</i> , 2000
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	CH34	Souche sauvage	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
	AE104	Souche CH34 curée des 2 méga-plasmides pMOL28 et pMOL30	Mergeay <i>et al.</i> , 1985
<i>Burkholderia phenazinium</i>	DSM10684	Souche isolée du sol	Viallard <i>et al.</i> , 1998
<i>Shewanella frigidimarina</i>	NCIMB400	Bactérie marine isolée de la mer du Nord	Reid <i>et al.</i> , 1999
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	PYR-1	Bactérie isolée de sédiments contaminés au pétrole	Khan <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	Souche de référence séquencée	Nelson <i>et al.</i> , 2002
	KT2440-2431	Mutant dépourvu de pompes d'efflux de métaux	Leedjarv <i>et al.</i> , 2008
<i>Alcaligenes sp.</i>	Y1013H	Isolat provenant d'eaux de surface collectées le long du bassin de l'Isle	Quemeneur <i>et al.</i> , 2008
PLASMIDES	pCR2.1 pGEM-T pUM3	<i>LacZ</i> α M13 T7 M13(-20) (Km ^r) (Amp ^r) pUC <i>LacZ</i> (Amp ^r) Contient l'ensemble de l'opéron <i>ars</i> du plasmide R773 d' <i>E. coli</i>	Invitrogen Promega Mobley <i>et al.</i> , 1983
	pF1 pCR2.1- <i>arsB</i> pCR2.1-ACR3 pCR2.1- <i>cadA</i> pCR2.1- <i>aioA</i>	Contient le gène <i>ACR3</i> de <i>Microbacterium sp.</i> A33 Insertion du gène <i>arsB</i> dans pCR2.1 Insertion du gène <i>ACR3</i> dans pCR2.1 Insertion du gène <i>cadA</i> dans pCR2.1 Insertion du gène <i>aioA</i> de la souche Y1013H dans pCR2.1	Achour <i>et al.</i> , 2010 Ce travail Ce travail Ce travail Ce travail

Tableau 4 : Souches bactériennes et plasmides

IV.2. EXTRACTION DES ADN GENOMIQUES

Les ADN génomiques ont été extraits directement d'environ 1g de sol à l'aide du kit « FastDNA Pro Soil » (MP Biomedicals) en suivant le protocole prescrit par le fournisseur.

IV.3. EXTRACTION DES ARN TOTAUX A PARTIR D'ECHANTILLONS DE SOLS

IV.3.1. PREMIERE METHODE D'EXTRACTION

Les ARN ont été extraits de 10 ml de culture, 5 g de sable ou 1 g de sol à l'aide du kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » (MP Biomedicals) en suivant le protocole du fournisseur.

IV.3.2. SECONDE METHODE D'EXTRACTION (Monard *et al.*, 2010)

Cette seconde extraction a été réalisée en suivant le protocole établi par Monard *et al.* (2010). Dans un premier temps, il faut équilibrer le pH du phénol pour l'amener à pH 6,6, pH optimal pour l'extraction des ARN.

IV.3.2.1. Equilibrage du phénol

Le phénol est chauffé à 68°C dans un bain marie afin de le rendre liquide. Au phénol chaud, un volume équivalent de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,6) est ajouté. La solution ainsi obtenue est mélangée sur un agitateur magnétique pendant 15 minutes. Cette solution est ensuite retirée de l'agitateur et quand les 2 phases se sont séparées, la phase supérieure aqueuse est aspirée précautionneusement.

Un volume équivalent de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,6) est à nouveau ajouté au phénol et les étapes décrites précédemment sont répétées autant que nécessaire jusqu'à ce que la phase phénolique soit au pH désiré, en l'occurrence pour une extraction d'ARN, à pH légèrement acide, voisin de 6,6.

Une fois que le phénol est équilibré et que la phase aqueuse a été enlevée, 0,1 volume de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,6) contenant 0,2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol est ajouté. Le β -mercaptoéthanol est un inhibiteur des RNases. La solution de phénol est donc stockée sous cette forme dans une bouteille opaque à 4°C pendant une période d'environ un mois.

IV.3.2.2. Extraction des ARN totaux

Le mélange réactionnel, décrit dans le Tableau 5, est traité dans un vibro-broyeur MM200 (Retsch) à une fréquence de 25 Hz (1500 tr/min) pendant 3 min. Chaque minute, les tubes sont rapidement givrés dans de l'azote liquide.

Sol	250 mg
"Glass Beads" (106 µm ; Sigma)	2 mg
SDS 20%	33,5 µl
Tampon phosphate 0,1 M pH 6,6	200 µl
Terre de diatomée 3% (Sigma)	170 µl
Phénol pH 6,6 – 0,2 % β-mercaptoéthanol (v/v)	800 µl

Tableau 5 : Composition de mélange pour l'extraction des ARN totaux de sol

Après une centrifugation des tubes à 15000 g, à 4°C pendant 10 min, le surnageant est prélevé puis additionné d'un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1, pH 6,6). Ces nouveaux tubes sont centrifugés à 20000 g, à 4°C pendant 15 min et un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24 ; 1) est ajouté au surnageant. Une centrifugation à 20000 g, à 4°C pendant 15 min est réalisée, le surnageant est récupéré et 0,1 volume de chlorure de lithium LiCl et 2,5 volume d'éthanol froid (100%) lui sont ajoutés. A ce stade de l'extraction, les acides nucléiques peuvent être laissés toute la nuit à -80°C afin de précipiter.

Les tubes sont, par la suite, centrifugés à 20000 g, à 4°C pendant 30 min. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 500 µl d'éthanol froid (75%). Une autre centrifugation à 20000 g, à 4°C pendant 5 min peut être effectuée, si le culot s'est décollé.

Les ARN totaux ainsi obtenus sont nettoyés en utilisant 1 ml de TriReagent RNA/DNA/Protein Solution reagent (Molecular Research Center, Inc.) en suivant les indications du fournisseur. Les culots d'ARN finaux sont suspendus dans 50 µl d'eau ultrapure DNase-RNase free (traitée au Diethyl pyrocarbonate (DEPC)).

IV.4. PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES

IV.4.1. PURIFICATION DES ARN

Les ARN ont été purifiés en suivant la procédure du kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » (MP Biomedicals). Afin d'éliminer une éventuelle contamination par de l'ADN, les aliquots de

chaque échantillon d'ARN ont été traités par 7 unités de DNase I RNase-Free (QIAGEN). Ensuite, les colonnes « RNeasy Mini Kit » ont été utilisées pour éliminer la DNase I. Les concentrations en ARN ont été déterminées par un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Labtech). Les échantillons ont ensuite été stockés à -80 °C dans le cas où ils n'ont pas été rétrotranscrits immédiatement.

IV.4.2. PURIFICATION DES ADN

Les ADN ont été purifiés en utilisant le kit « FastDNA » (MP Biomedicals) en suivant les recommandations du fournisseur.

IV.5. TRANSCRIPTION INVERSE

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir d'environ 800 ng d'ARN, quantifiés au Nanodrop, avec le kit « Superscript III First-Strand Synthesis System » (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur.

IV.6. AMPLIFICATION PAR PCR

L'amplification des gènes *arsB*, *ACR3*, *aioA* et des gènes codant pour des ATPases de type P a été réalisée à l'aide des couples d'amorces indiqués dans le Tableau 6 et le protocole utilisé pour amplifier ces gènes est décrit dans le Tableau 7. Les conditions d'amplification des gènes de résistance à l'arsenic ont été décrites précédemment (Rokbani *et al.*, 2007). La conception des amorces ciblant les ATPases, l'optimisation des conditions d'amplification et l'étude de leur spécificité sont présentées dans le chapitre x de la partie « Résultats ».

Gène cible	Primer	Séquence 5' → 3'	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation (°C)	Référence
ARNr 16S	1401R	CGG TGT GTA CAA GAC CC	450 environ	56	Felske <i>et al.</i> , 1998
	968F	AAC GCG AAG AAC CTT AC			
	968F-GC	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCC CCG CCC CCG CCC-968F		Touch Down	
ARNr 16S	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	56	Lane, 1991
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT			
ARNr 16S	W49	ACG GTC CAG ACT CCT ACG GG		61	Delbès <i>et al.</i> , 2001
	W34-FAM	FAM- TTA CCG CGG CTG CTG GCA C			
arsB	darsB1F	GGT GTG GAA CAT CGT CTG GAA YGC NAC	750 environ	57-52°C (PCR)	Rokbani <i>et al.</i> , 2007
	darsB1R	CAG GCC GTA CAC CAC CAG RTA CAT NCC		53°C (RT - PCR)	
ACR3	dacr1F	GCC ATC GGC CTG ATC GTN ATG ATG TAY CC	750 environ	57-52°C (PCR)	Rokbani <i>et al.</i> , 2007
	dacr1R	CGG CGA TGG CCA GCT CRA ART TRT T		53°C (RT - PCR)	
aioA	aioAM1-2F	CCA CTT CTG CAT CGT GGG NTG YGG NTA	550 environ	57,6	Quéméneur <i>et al.</i> , 2010
	aioAM2-1R	GGA GTT GTA GGC GGG CCK RTT RTG DAT			
PCR	M13 For	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	/	53	Invitrogen
	M13 Rev	AGG AAA CAG CTA TGA CCA T			

(N = G ou A ou T ou C ; Y = T ou C ; M = A ou C ; K = G ou T ; R = G ou A ; D = G ou A ou T)

Tableau 6 : Caractéristiques des oligonucléotides utilisés pour cette étude

Cycle (répétitions)	Etape		Description
	arsB et ACR3	aioA	
Cycle 1 (1)	94°C - 5 min	94°C - 5 min	Dénaturation de l'ADN
Cycle 2 (10)	94°C - 45 s	94°C - 30 s	
	57°C - 45 s (Diminution de 0,5°C à chaque cycle)	57,6°C - 30 s	Hybridation des amorces
	72°C - 30 s	72°C - 45 s	Elongation des brins d'ADN
Cycle 3 (25)	94°C - 45 s	94°C - 30 s	
	52°C - 45 s	57,6°C - 30 s	Hybridation des amorces
	72°C - 30 s	72°C - 45 s	Elongation des brins
Cycle 4 (1)	72°C - 5 min	72°C - 7 min	

Tableau 7 : Programme PCR pour les gènes arsB, ACR3 et aioA

IV.7. QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL

Cette technique a été appliquée afin de quantifier le nombre de copies des gènes et des transcrits *16S* et développée afin de quantifier le nombre de copies des gènes *arsB*, *ACR3*, *aioA* et de leurs transcrits au sein d'une communauté bactérienne.

IV.7.1. PRINCIPE

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits mais également à la quantité de gène cible initialement présente dans le système. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN tandis que la PCR classique ne donne que la mesure finale. L'agent intercalant utilisé est le SYBR Green I. Il est peu fluorescent à l'état libre et il augmente en fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (Figure 22).

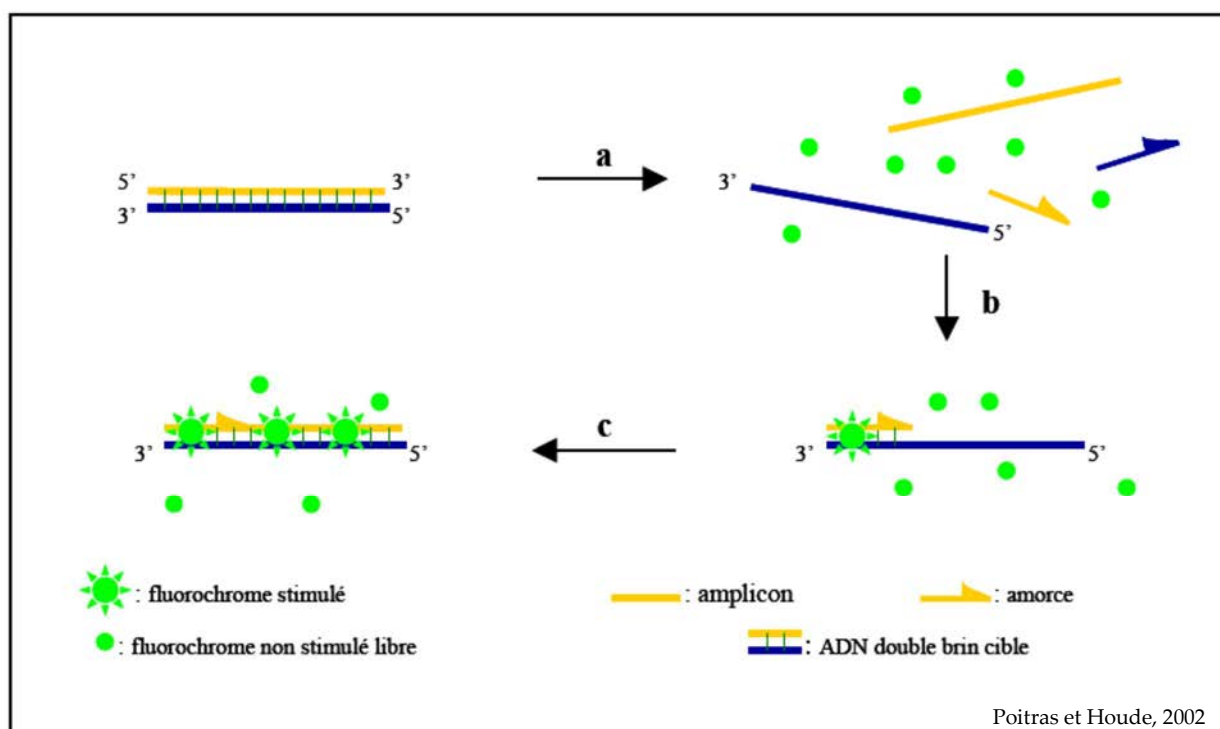


Figure 22 : Fixation du SYBR Green I à l'ADN double brin. (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I exhibe peu de fluorescence. (b) A la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivie en temps réel.

Afin de quantifier par PCR en temps réel le nombre de copies d'un gène dans un échantillon d'ADN extrait, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. Ce point est défini comme étant le cycle seuil ou « threshold cycle » (Ct) et correspond au début de la phase exponentielle d'amplification. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des quantités connues de gènes.

La spécificité de la réaction basée sur la détection du SYBR Green I repose entièrement sur la spécificité des amorces utilisées. Un mauvais appariement des amorces entraîne des amplifications non spécifiques c'est-à-dire des faux positifs conduisant donc à une surestimation de la quantité de gènes. C'est pour cette raison que l'analyse de la courbe de dissociation est importante. Cette courbe est obtenue à la fin des cycles d'amplification par une augmentation progressive de la température jusqu'à 95°C, afin de dénaturer, à nouveau, l'ADN amplifié tout en mesurant le signal fluorescent. Par conséquent, la présence de plus d'un pic peut alerter sur la formation de produits non spécifiques. Ce n'est pas le cas avec des échantillons d'ADN issus de milieux complexes comme un sol et/ou lors de l'utilisation d'amorces dégénérées susceptibles de produire des courbes de dissociation moins nettes du fait de la diversité des amplicons.

IV.7.2. PREPARATION DES GAMMES STANDARDS

Afin de quantifier les gènes d'intérêt, des gammes standard ont été réalisées à partir des plasmides pCR2.1 contenant des gènes codant des protéines des deux familles ArsB et Acr3p de transporteur d'As(III) et d'ATPases de type P. Les deux premiers gènes ont été préalablement amplifiés avec les amorces décrites dans le tableau 6 à partir des plasmides pF1 et pUM3 (Tableau 4) contenant respectivement l'opéron *ACR3* de *Microbacterium* sp. A33 et le gène *arsB* du plasmide R773 d'*E.coli*. Le fragment *cadA* a été amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche *P. putida* KT2440. Les plasmides pCR2.1 contenant les gènes d'intérêt ont été digérés par l'enzyme de restriction *Bam*HI pendant 1 h à 37°C.

La concentration des solutions d'ADN plasmidique, mesurée par spectrophotométrie, est exprimée en ng/μl. La valeur obtenue est convertie en (copies de gènes)/μl, après avoir calculé la masse du plasmide par la formule suivante :

$$m = (n \times M_{pb}) / A$$

avec **m** la masse du plasmide contenant l'insert (en g)

n la taille du plasmide (en pb)

M_{pb} la masse moléculaire d'une paire de base (= 660 g/mole)

et **A**, le nombre d'Avogadro (= 6,023 X 10²³ molécules/mole)

Les gammes étalon ont été obtenues par dilution décimale à partir d'une solution stock contenant 10⁹ copies de plasmide pour obtenir des quantités de gènes comprises entre 10⁸ à 10¹ copies/μl.

IV.7.3. MELANGE REACTIONNEL ET CONDITIONS

D'AMPLIFICATION

La PCR en temps réel a été réalisée dans un thermocycleur MyIQ (Biorad). Les mélanges réactionnels et les programmes PCR sont décrits dans les tableaux 8 et 9.

L'abondance des gènes ciblés *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans une communauté bactérienne a été calculée selon la formule suivante :

$$(\text{Nombre de copies du gène cible}) / (\text{Nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S})$$

Le niveau d'expression des gènes cibles dans une communauté bactérienne a été calculé selon la formule suivante :

$$(\text{Nombre de copies des ADNc Y}) / (\text{Nombre de copies du gène Y})$$

en considérant que le nombre de copies des ADNc Y correspond à la quantité d'ARNm de ce gène Y.

Réactifs	Volume (μl)
IQ SYBR Green SuperMIX (Biorad)	10
Amorce sens (5 μM)	0,8
Amorce antisens (5 μM)	0,8
BSA (3%)	0,4
DMSO	0,2
T4gp32	0,08
H ₂ O	q.s.p. 19

Tableau 8 : Mélange réactionnel utilisé en PCR en temps réel

Cycle (répétitions)	Étapes	Température (°C)			Temps
		<i>aioA</i>	<i>arsB</i> et <i>ACR3</i>	16 S	
1 (1)	1	95	95	95	5 min
2 (50)	1	95	95	95	30 s
	2	57,6	53	56	30 s
	3	72	72	72	30 s
	Collecte des données et analyses en temps réel				
3 (1)	1	72	72	72	7 min
4 (1)	1	95	95	95	30 s
5 (80)	1	51	51	51	10 s
	Augmentation progressive de la température				
	Collecte et analyses des données de courbe de dissociation				
6 (1)	1	4			HOLD

Tableau 9 : Programme utilisé en PCR en temps réel

IV.8. CLONAGE ET SEQUENÇAGE

IV.8.1. PURIFICATION DES PRODUITS PCR ET LIGATION

PLASMIDIQUE

Les produits d'amplification, obtenus à partir d'ADN ou d'ADNc, ont été purifiés grâce aux kits « GENE CLEAN Turbo » (MP Biomedicals) ou « Cycle Pure E.Z.N.A » (Omega). Les produits PCR ainsi purifiés ont été insérés par ligation dans le plasmide pGEM®-T System I (Promega) selon les instructions du fournisseur.

IV.8.2. TRANSFORMATION D'*E. coli*

Le mélange de ligation est mis en présence des bactéries *E. coli* TOP10 rendues compétentes par traitement au CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989) pendant 25 min dans la glace. Puis ces bactéries subissent un choc thermique de 45 s à 42°C. Elles sont ensuite incubées 2 min dans la glace. Finalement, 250 µl de milieu LB leur sont ajoutés et la suspension bactérienne est ensuite placée 1 h à 37°C sous une agitation de 200 rpm. Ces suspensions bactériennes sont étalées un milieu gélosé LB-ampicilline (100 µg/ml) et de X-Gal (80 µg/ml). Les bactéries formant des colonies blanches sur ce milieu auront été transformées par le plasmide contenant l'insert. Une amplification par PCR est ensuite réalisée directement sur ces clones pour vérifier la présence et la taille de l'insert. Les produits PCR sont ensuite purifiés par le kit « Cycle Pure E.Z.N.A » (Omega) en suivant les recommandations du fournisseur et le séquençage de ces produits est réalisé par le service Eurofins MWG Operon. Alternativement, l'ADN plasmidique a été extrait des clones recombinants à l'aide du kit « Qiaprep Spin Miniprep » (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur.

IV.8.3. CRIBLAGE DES TRANSFORMANTS ET SEQUENÇAGE

Le séquençage des produits PCR ou des ADN plasmidiques a été réalisé par le service Eurofins MWG Operon.

IV.9. ALIGNEMENT DES SEQUENCES

Les séquences nucléotidiques sont d'abord vérifiées manuellement en analysant le chromatogramme correspondant. Elles subissent ensuite plusieurs analyses comme l'élimination de l'ADN vectoriel et l'identification de phases ouvertes de lecture (dans le cas de séquences codantes). La recherche de similarités de séquence avec les séquences répertoriées dans les banques de données a été réalisée à l'aide des programmes BLAST N (comparaison d'une séquence nucléotidique à une banque de séquences nucléiques) et BLAST X (comparaison des 6 cadres de lecture d'une séquence nucléotidique à une banque de séquences protéiques).

Le programme CLUSTALW a été utilisé pour aligner les séquences protéiques. La méthode « Neighbor-Joining » a permis d'élaborer des arbres de données phylogénétiques. L'analyse des séquences a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

IV.10. CONCEPTION DES AMORCES OLIGONUCLEOTIDIQUES

L'objectif est de concevoir des amorces oligonucléotidiques dégénérées à l'aide du programme CoDeHOP (Rose *et al.*, 1998) ciblant les gènes codant des ATPases de type P_I, dans le but de développer une approche de quantification de ces gènes par PCR en temps réel.

Une vingtaine de séquences protéiques codant pour des ATPases de type P_{IB} issues de bactéries appartenant à différentes classes ont été choisies comme références afin de dessiner les amorces oligonucléotidiques dégénérées. Ces séquences sont répertoriées dans le tableau 10. Un alignement de ces séquences a ensuite été traité par le programme CoDeHOP. Les amorces hybrides, ainsi générées à partir de motifs protéiques conservés, se présentent sous la forme d'un noyau dégénéré court en 3', le core, et d'une séquence non dégénérée en 5', appelée le clamp. Les amorces ainsi dessinées, testées et utilisées pour cibler les ATPases de type P_I sont présentées dans le tableau 11. Cette méthode permet de surmonter les problèmes rencontrés par la PCR dégénérative (PCR utilisant des amorces entièrement dégénérées) et par la PCR consensus (PCR utilisant des amorces totalement complémentaires des brins matrices).

Bactérie	Numéro d'accension GenBank	Classe
<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	94554270	Deinococcus-Thermus
<i>Brucella abortus</i> bv. 1 str. 9-941	62196995	α -proteobacteria
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	222085726	
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	119385075	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> BL225C	307309578	
<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551	83749132	
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	56130719	β -proteobacteria
<i>Gallionella ferruginea</i> ES-2	302877512	
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91	114307129	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38639700	
<i>Yersinia pestis</i> KIM 10	21957099	γ -proteobacteria
<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	260218947	
<i>P. putida</i> KT2440	26991815	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	242378990	
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	15645410	
<i>Bacillus subtilis</i>	81815569	Firmicute
<i>Bacillus cereus</i> Rock3-44	229083833	
<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM7271	256819088	Bacteroidetes

Tableau 10 : Bactéries références et numéro d'accension des séquences protéiques

Gène cible	Primer	Séquence 5' → 3'	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation (°C)	Référence
	CadD1-For	GGCTGCCCTGCGCHCTSGTBAT	750	56	Ce travail
	CadL5-Rev	CGGGGGCGTCGTTRATNCCRTC			Ce travail
ATPases de type P _{IB}	ATPaseD3-For	GGGCCTGGTCCTCCTGGTGATCGGCTGY CCNTGYGC	750	58	Ce travail
	ATPaseL4-Rev	GTGCCATGGCGGGGGCGTCGTTDATNCC RTC			Ce travail
	ATPaseD4-For	GTCCTCCTGGTGATCGGCTGCCCTGYGC NYTNGT			Ce travail

(N = G ou A ou T ou C ; Y = T ou C ; M = A ou C ; K = G ou T ; R = G ou A ; D = G ou A ou T)

Tableau 11 : Caractéristiques des oligonucléotides testés dans cette étude sur les ATPases de type P_{IB}

IV.11. ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE

IV.11.1. PCR-TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis)

IV.11.1.1. Conditions de PCR

Les amorces utilisées pour les amplifications des fragments destinés à la TTGE sont présentées dans le tableau 6. Pour la PCR sur le gène codant les ARNr 16S, un programme “touch-down” a été utilisé, constitué de 19 cycles avec une température d’hybridation diminuant de 63°C à 54°C (-1°C tous les 2 cycles) puis 15 cycles avec une température d’hybridation de 54°C (Felske *et al.*, 1998 ; Muyzer et Smalla, 1998).

IV.11.1.2. Préparation et condition de migration des gels

TTGE

La composition des gels (Cebon *et al.*, 2009) est la suivante : 6% m/v d’acrylamide/bisacrylamide (Sigma®), 7 M d’urée (Euromedex), 2% v/v de glycérol dans du tampon TAE à 1,25X (1X correspond à 40 mM Tris-acétate, 20 mM acide acétique et 1 mM EDTA, pH 8,3). Après filtration, la polymérisation est initiée par ajout de 300 µl de persulfate d’ammonium 10% m/v (Euromedex) et 30 µl de N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED, Euromedex) pour un gel de 30 ml.

Les électrophorèses ont été effectuées dans un appareil DCode system (BioRad) à migration verticale, suivant un gradient de température allant de 57°C à 67°C à raison d'une augmentation de 2°C par heure sous une tension de 130 V.

Après la migration, les acides nucléiques ont été marqués par incubation dans un bain de SYBR® Gold (1/10 000 final, Molecular Probes®) et les images prises au transilluminateur (Geldoc) ont été analysées avec le logiciel QuantityOne 4.01 (Biorad).

IV.11.2. PCR-CE-SSCP

IV.11.2.1. Conditions de PCR

Les mélanges réactionnels et les programmes PCR sont décrits dans les tableaux 12 et 13. Les amorces W49 et W34-FAM sont décrits dans le tableau 6.

Go Taq (Promega)	0,15 µl
Tampon 5X	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,15 µl
Amorce W49 (20 pmol/µl)	0,3 µl
Amorce W34-FAM (20 pmol/µl)	0,3 µl
H ₂ O	q.s.p. 15 µl

Tableau 12 : Mélange réactionnel utilisé en PCR CE-SSCP

Cycle (répétitions)	Etape
	16S
Cycle 1 (1)	95°C - 2 min
Cycle 2 (28)	95°C - 30 s
	61°C - 30 s
	72°C - 30 s
Cycle 4 (1)	72°C - 5 min

Tableau 13 : Programme utilisé en PCR CE-SSCP

IV.11.2.2. Protocole expérimental

Une des deux amorces est marquée par le fluorophore FAM (fluorescence bleue) ce qui aboutit au marquage d'un seul des deux brins des amplicons. Les amplicons sont déposés sur un gel d'agarose 2% afin de vérifier la qualité de l'amplification et d'estimer la dilution nécessaire pour la CE-SSCP. Les produits PCR (1 μ l), dilués 200 fois pour les échantillons incubés et 10 fois pour l'ADN au temps 0, sont mélangés à 18,8 μ l de formamide déionisée et 0,2 μ l d'ADN standard interne 600 LIZ (AB Applied Biosystems). Ce standard interne, fusionné au fluorophore LIZ (fluorescence orange) permet de réaligner les échantillons les uns par rapport aux autres en s'affranchissant des modifications de migration et donc de comparer les profils de l'ensemble des échantillons. Les ADN sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 10 min puis rapidement refroidis à 0°C. Chaque simple brin d'ADN adopte alors une conformation unique, qui dépend de sa séquence, et répétable. Les électrophorèses capillaires ont été effectuées dans un appareil ABI310 (Applied Biosystems) à voltage (12 kV) et température (32°C) constants. Les profils ont été analysés avec le logiciel GeneScan (Applied Biosystems).

V. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLStat 2010 (Addinsoft) avec $\alpha < 0,05$. Lorsque plusieurs modalités d'un facteur ou plusieurs facteurs étaient comparés, des analyses de la variance (ANOVA), suivies de test de comparaisons multiples de Newman-Keuls, ont été appliquées.

Dans le cas des cultures d'enrichissement en présence d'arsenic (**Chap. III – Partie III**) et malgré le fait que les prélèvements aux différents temps ont été effectués dans le même échantillon, des ANOVA à 2 facteurs ont été appliquées ; nous avons considéré que, dans cette expérience, les mesures prises sur un même sujet à des périodes différentes sont indépendantes.

Pour l'étude de la dynamique de l'abondance *in situ* des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans les terres multi-contaminées de Neuves-Maisons (**Chap. III – Partie V**) et pour les expériences en microcosmes de sol (**Chap. III – Partie VI**), des ANOVA à 2 facteurs ont été appliquées car les échantillons étaient sacrifiés à chaque temps de prélèvement.

Les tests utilisés seront rappelés au début de chaque section au moment où les plans expérimentaux seront détaillés.

CHAPITRE III

RESULTATS

PARTIE I : MISE AU POINT DE LA QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* ET DE LEURS TRANSCRITS

I.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Au cours d'une précédente étude, Asma Rokbani-Achour *et al.* (2007) ont dessiné des amorces PCR dégénérées permettant la détection spécifique des gènes codant les transporteurs d'As(III) ArsB et ACR3. Ces amorces ont été utilisées pour analyser l'occurrence de ces gènes et leur diversité dans une collection de bactéries isolées de sols contaminés à l'arsenic et pour déterminer d'éventuelles corrélations entre leur présence, le niveau de contamination des sols, l'affiliation phylogénétique des isolats et leurs degrés de résistance à l'arsenic. Les principales conclusions de cette étude sont que (i) la famille des transporteurs ACR3 est largement répandue chez les bactéries et que (ii) la présence des gènes *arsB* et *ACR3* et/ou leur affiliation phylogénétique ne peuvent pas être utilisées comme seuls critères pour prévoir le comportement des communautés bactériennes en présence d'arsenic (Achour-Rokbani *et al.*, 2007). En revanche, les auteurs suggéraient que l'expression des gènes *arsB* et *ACR3* pouvait constituer un biomarqueur pertinent d'exposition à l'arsenic pour les communautés microbiennes et ainsi un outil d'évaluation de sa biodisponibilité dans les milieux contaminés. Le premier objectif de cette thèse a été de tester cette hypothèse, ce qui nécessitait dans un premier temps de développer une méthode de quantification des gènes *arsB* et *ACR3* par PCR en temps réel, à partir des amorces déjà existantes.

Quemeneur *et al.* (2010) ont appliqué la PCR en temps réel au gène *aioA* afin de comparer l'abondance des populations bactériennes As(III)-oxydantes aérobies dans différentes eaux du bassin de l'Isle (France) polluées par l'arsenic. Néanmoins, les échantillons analysés n'étaient pas suffisamment nombreux et variés pour montrer une corrélation claire entre les concentrations en arsenic, sa spéciation et le nombre de copies de gènes *aioA*. Par ailleurs, l'oxydation de l'As(III) par les bactéries hétérotrophes peut être considérée comme un processus de détoxification (cf § II.1.2.1. du chap. « Etat de l'art »). Dans une seconde partie de cette thèse, nous avons utilisé la technique de PCR en temps réel développée par Quemeneur

et al. (2010) afin de déterminer si les gènes codant l'As(III)-oxydase et leurs transcrits pouvaient également constituer un marqueur du stress arsenic chez les bactéries.

Cette partie du chapitre « Résultats » traite donc de la mise au point et/ou de l'optimisation de ces méthodes de quantification par PCR en temps réel, de l'extraction des ARN totaux et de la rétro-transcription de ces ARN.

I.2. CHOIX DES AMORCES ET PREPARATION DES PLASMIDES STANDARDS POUR LA PCR EN TEMPS REEL

Les amorces doivent être choisies de façon à assurer la spécificité de l'amplification. En effet, dans une réaction de PCR en temps réel, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'accumulation du produit PCR. En revanche, lors du dosage par SYBR Green, si les amorces forment des dimères ou si un (ou des) produit(s) d'amplification non spécifique(s) s'accumule(nt), les résultats peuvent être biaisés et inexploitable(s). De plus, dans le cas d'une quantification des ADNc, l'ADN génomique ne doit pas être amplifié.

Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser deux couples d'amorces, dessinés par Achour-Rokbani *et al.* (2007), ciblant la famille de gènes *arsB* (darsB1F/darsB1R) et le sous-groupe *ACR3(1)* (dacr1F/dacr1R) de la famille de gènes *ACR3*.

Pour l'amplification des gènes *aioA*, nous avons repris les amorces aoxBM1-2F et aoxBM2-1R dessinées par Quéméneur *et al.* (2008 ; 2010) et développé le protocole d'amplification décrit dans le tableau 9 du chapitre « Matériels et Méthodes ».

Afin de réaliser les courbes de calibration nécessaires à la quantification de ces trois gènes par PCR en temps réel, des plasmides standards ont été construits selon la stratégie de clonage présentée dans la figure 23. Puis ces plasmides ont été linéarisés par l'enzyme de restriction *Bam*HI, comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ IV.7.2.).

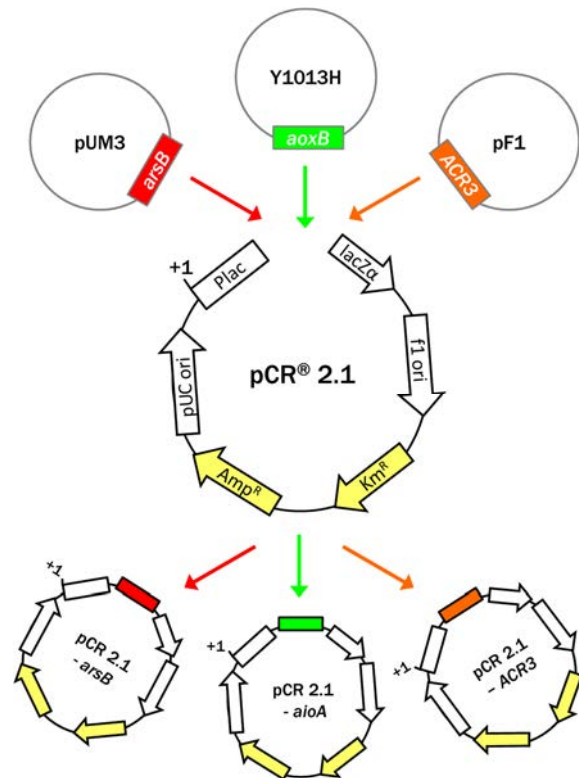


Figure 23 : Stratégies de clonage des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans le plasmide *pCR2.1*

I.3. RESULTATS

I.3.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'AMPLIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL

L'efficacité d'amplification est un paramètre essentiel dans la technique de PCR en temps réel. Afin de comparer des échantillons, elle doit être constante pour chacun d'entre eux. Les efficacités d'amplification sont similaires pour les deux standards de chacun des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA*, ce qui témoignent d'une variabilité très faible entre les runs indépendants, et cela pour chacune des trois gammes standards (Figure 24). Les courbes de calibrations sont linéaires ($R^2 > 0,99$) sur sept ordres de grandeur compris entre 10^8 à 10^1 copies de gènes, excepté pour le gène *arsB* dont la limite de détection est 10^2 copies de gènes, comme le montre la figure 24. Les efficacités d'amplification, calculées à partir de la pente des courbes, sont égales à 112 % pour le gène *arsB*, de 92 % pour le gène *ACR3* et de 74 % pour le gène *aioA*.

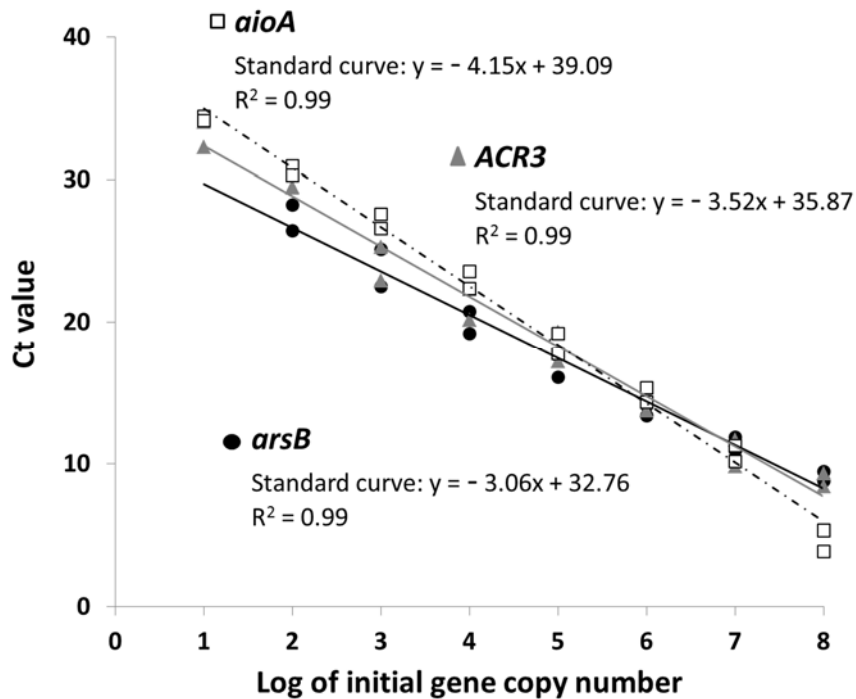


Figure 24 : Courbes de calibration des gènes *arsB* (noir), *ACR3* (gris) et *aioA* (pointillés) issues des amplifications par PCR en temps réel. Les différents points correspondent au logarithme du nombre de copies des gènes (équivalent au nombre de copies des plasmides) en fonction des valeurs de Ct. Les courbes de calibrations moyennes ont été calculées à partir de 2 amplifications indépendantes pour chacun des gènes

La spécificité de ces amplifications a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose ; nous pouvons constater, dans la figure 25, l'amplification d'un seul produit spécifique à chacun des gènes.

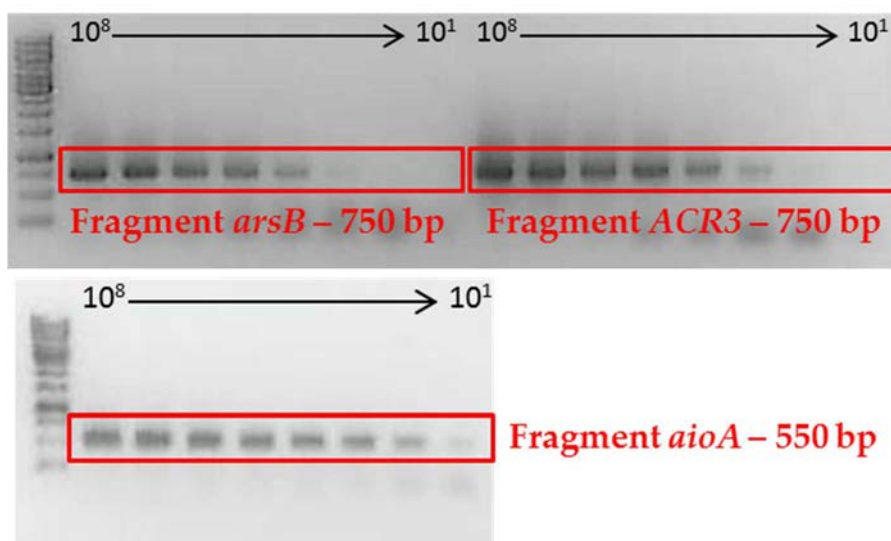


Figure 25 : Amplification par PCR en temps réel des dilutions décimales des plasmides pCR2.1-*arsB* (en haut à gauche), pCR2.1-*ACR3* (en haut à droite) et pCR2.1-*aioA* (en bas à gauche).

De plus, l'obtention d'un seul pic sur les courbes de fusion des gènes *arsB* (Figure 26A), *ACR3* (Figure 26B) et *aioA* (Figure 26C) confirme cette spécificité pour chacun des trois gènes. La température correspondant à l'hybridation des amorces durant l'amplification du gène *aioA* a été augmentée (57,6°C), par rapport au protocole (56°C) décrit par Quéméneur *et al.* (2010), afin d'améliorer la spécificité des amorces. En effet, une seconde bande non-spécifique était visualisable sur gel lorsque nous amplifions ces gènes à partir d'ADNc et l'augmentation de la température d'hybridation a permis de supprimer cette amplification non-spécifique.

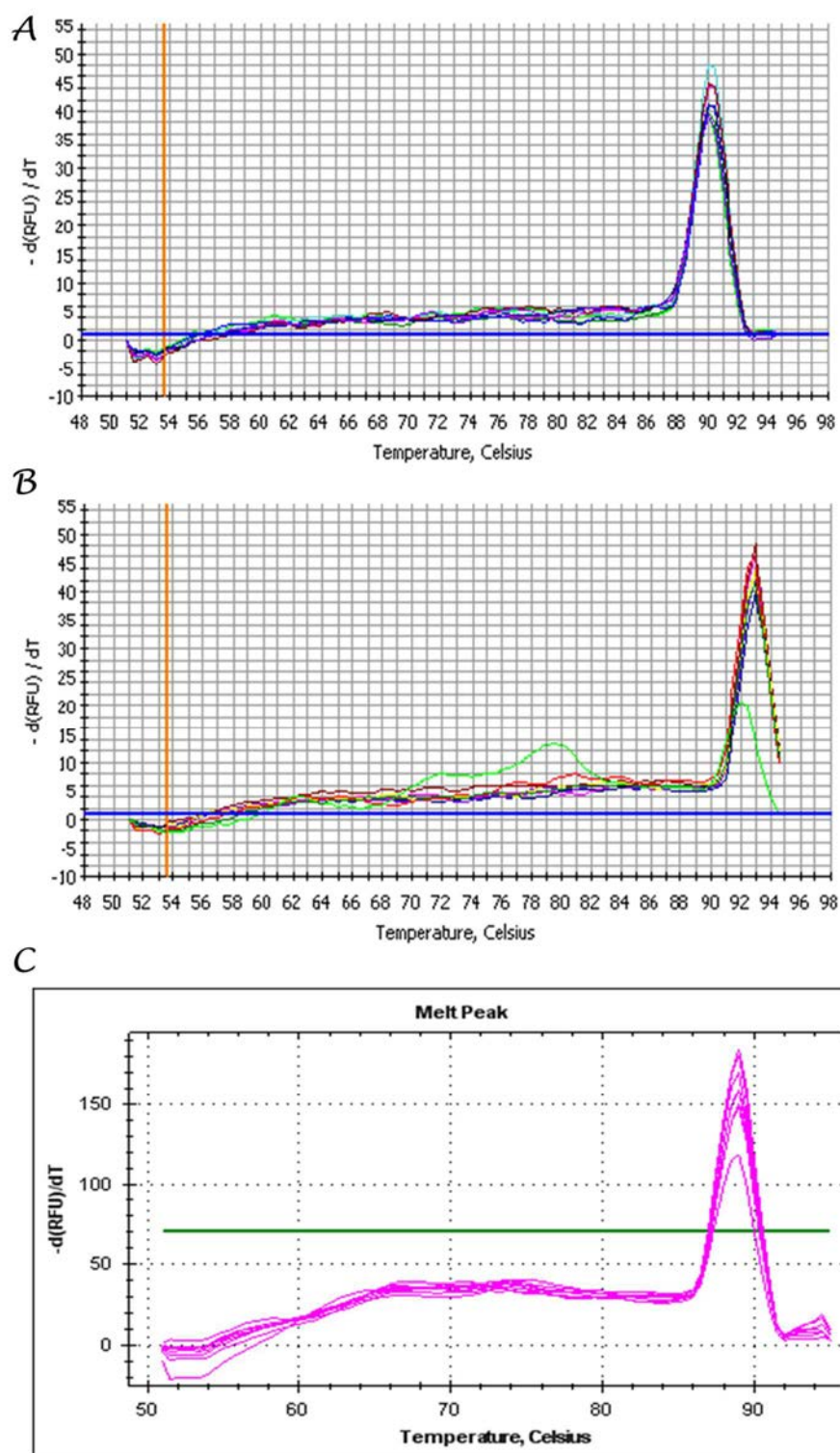


Figure 26 : Courbes de fusion obtenues à partir de la quantification par PCR en temps réel d'une dilution décimale des plasmides PCR2.1-arsB (A), PCR2.1-ACR3 (B) et PCR2.1-aioA (C)

I.3.2. VALIDATION DES CONDITIONS DE QUANTIFICATION

I.3.2.1. Démarche expérimentale

En raison des difficultés techniques liées à l'extraction des ARN bactériens à partir d'échantillons de sols (§ III.3.2 de l'état de l'art), nous avons choisi dans un premier temps de quantifier les gènes cibles et leurs transcrits dans des conditions expérimentales simplifiées : une communauté bactérienne, extraite du sol de la friche industrielle de Neuves-Maisons par centrifugation en gradient de densité (§ II.1.1. du Matériels et Méthodes), a été inoculée dans 30 ml de milieu LB, additionné d'arsénite de sodium (0,66 mM), d'arséniate de sodium (12,5 mM) ou d'un mélange des deux, et incubée à 24°C sous agitation pendant une semaine. Pour simplifier notre propos dans la suite de ce chapitre, l'arsénite de sodium sera noté As(III) et l'arséniate de sodium sera appelé As(V). Cette expérience a été réalisée avec trois réplicats et la démarche expérimentale est schématisée dans la figure 27. Les prélèvements ont été effectués après 2, 4, et 7 jours d'incubation. La croissance des cultures bactériennes a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm, et l'évolution du nombre de copies des ARN *arsB* et *ACR3* au sein de la communauté par RT-PCR en temps réel. La quantification de l'expression relative de ces gènes a été réalisée au moment du prélèvement à deux jours.

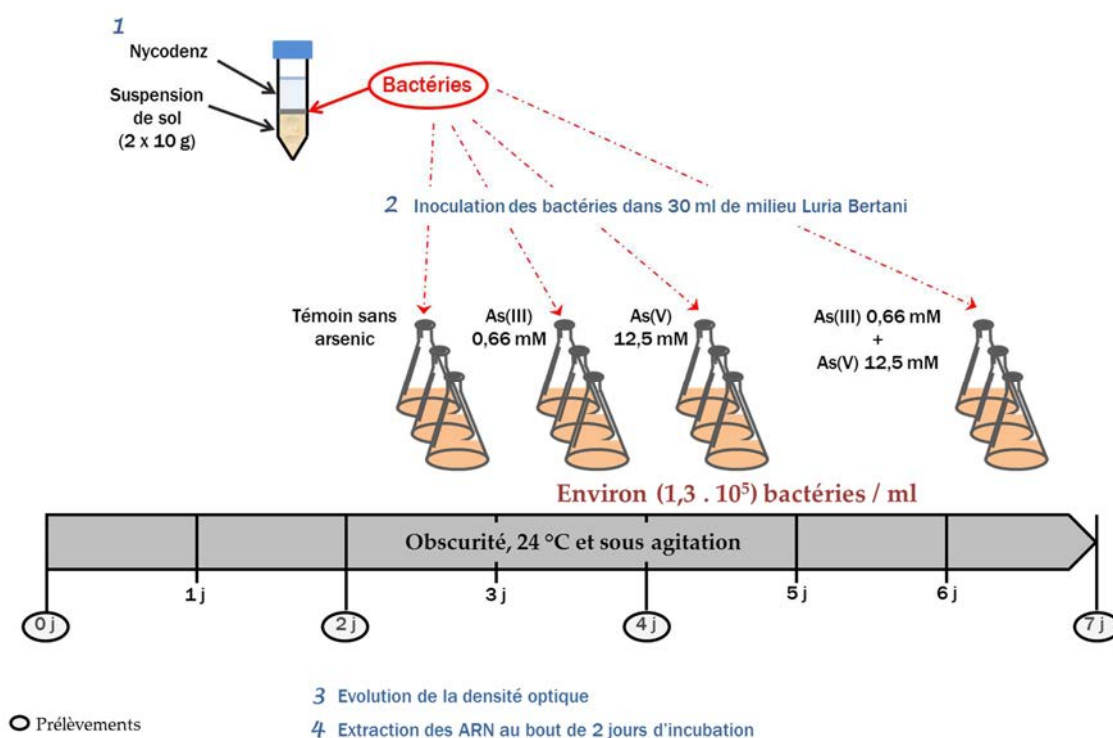


Figure 27 : Démarche expérimentale mise en place pour étudier la réponse d'une communauté bactérienne à l'As(III) et/ou à l'As(V)

I.3.2.2. Evolution de la densité optique au cours du temps

La figure 28 représente l'évolution de la densité optique à 600 nm pour chacune des cultures bactériennes. La croissance bactérienne est plus affectée en présence des deux formes d'arsenic qu'en présence d'une seule de ces deux formes puisqu'après sept jours d'incubation, la DO de ces cultures atteint seulement 1,8. Néanmoins, l'As(V) à une concentration de 12,5 mM s'avère plus toxique que l'As(III) à une concentration de 0,66 mM, ce qui se traduit par une croissance moins importante au bout de 7 jours d'incubation.

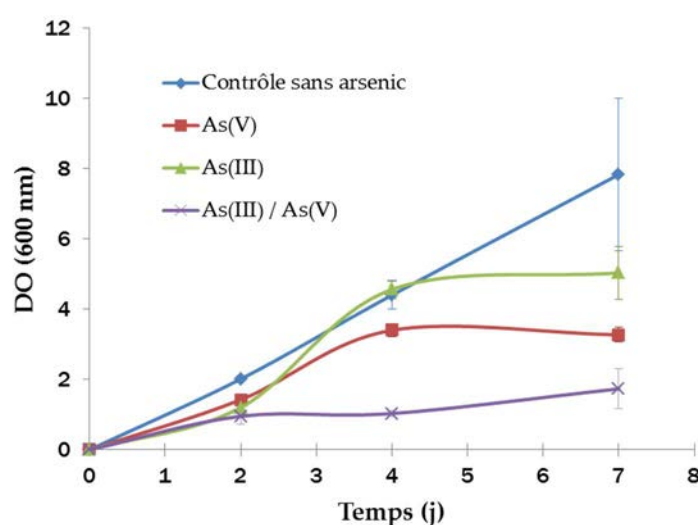


Figure 28 : Croissance des cultures bactériennes en présence d'As(III), d'As(V) et des 2 formes d'arsenic

I.3.2.3. Etude semi-quantitative de l'expression des gènes

arsB et *ACR3*

Les ARN ont été extraits à partir des échantillons de cultures après deux jours d'incubation (cf. § IV.3.1 du chap. « Matériels et Méthodes»). Après rétro-transcription, les ADNc ciblés *arsB* et *ACR3* ont été amplifiés par PCR en point final avec les amorces dégénérées qui leur sont spécifiques. Les produits d'amplification ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 29).

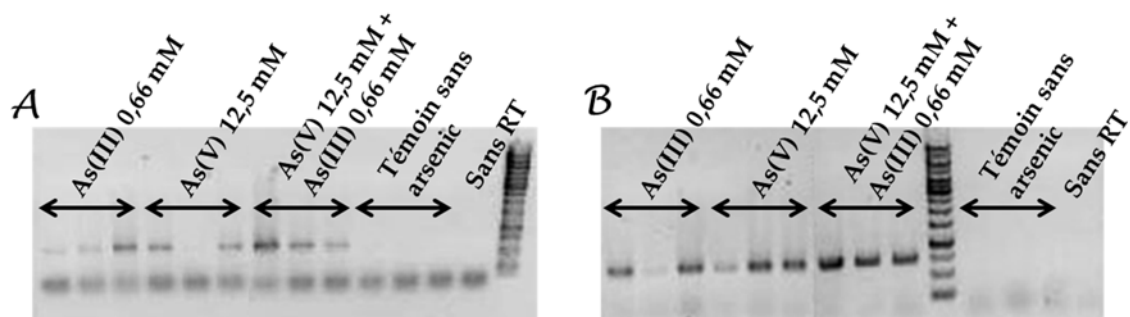


Figure 29 : Amplifications des ADNc *arsB* (A) et *ACR3* (B) extraits des cultures en présence des différentes concentrations en As(III) et en As(V)

En ce qui concerne les amplifications positives, une seule bande de la taille attendue (environ 750 pb) est observée, ce qui témoigne de la spécificité des amorces. Par ailleurs, les résultats indiquent clairement que les gènes d'intérêt ont été transcrits uniquement en présence d'arsenic, qu'il s'agisse d'As(III) ou d'As(V). En effet, aucune bande d'ADN n'est visible pour les échantillons correspondant aux contrôles c'est-à-dire aux bactéries cultivées en absence d'arsenic. De plus, des bandes plus intenses sont obtenues pour les échantillons (As(III) + As(V)), ce qui suggère que le niveau d'expression des gènes *arsB* et *ACR3* dépend des concentrations en arsenic dans le milieu. Cependant, il s'agit ici d'une analyse qualitative (PCR en point final) qui nécessite d'être affinée. C'est pour cette raison qu'une technique de PCR en temps réel a été développée afin de quantifier l'expression des gènes *ars* et *ACR3*.

I.3.2.4. RT-PCR en temps réel

La figure 30 rapporte l'expression relative des gènes *arsB* et *ACR3* dans les échantillons témoins (sans arsenic), avec 0,66 mM d'As(III), avec 12,5 mM d'As(V) et avec un mélange de ces deux formes à ces concentrations, après deux jours d'incubation. Les résultats ont été normalisés dans cette figure en rapportant le nombre de copies d'ARNm à une quantité fixe d'ARN total. Les données obtenues pour la condition « sans arsenic » sont considérées comme non détectables puisque le nombre de copies des ARNm *arsB* et *ACR3* est en dessous du seuil de quantification qui est 10^2 copies de gènes *arsB* et 10^1 copies de gènes pour *ACR3*. Néanmoins, nous avons conservé ces valeurs pour pouvoir calculer les facteurs d'induction de l'expression de ces gènes, répertoriés dans le tableau 14, par rapport aux cultures ne

contenant pas d'arsenic. Ces facteurs ont été calculés à partir des données de copies d'ARNm des gènes par copie d'ARNr 16S.

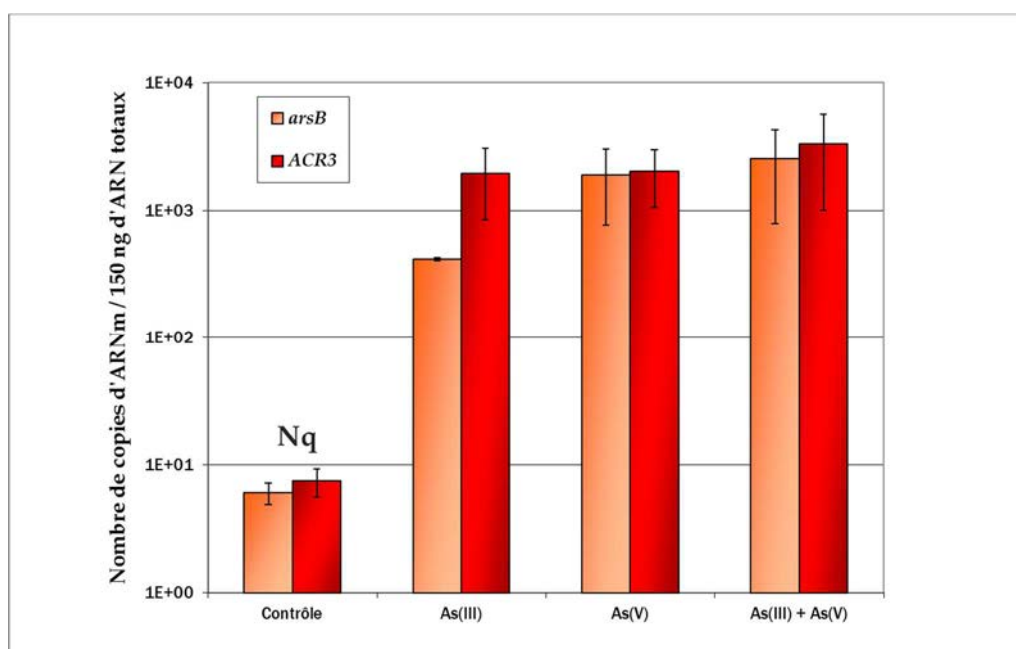


Figure 30 : Quantification de l'expression relative des gènes *arsB*, *ACR3* dans les différents batches au bout de 2 jours d'incubation. Le nombre de copies d'ARNm est présenté pour 150 ng d'ARN totaux. Nq signifie « Non quantifiable»

	As(III)	As(V)	As(III) + As(V)
<i>arsB</i>	30	144	706
<i>ACR3</i>	128	173	817

Tableau 14 : Facteurs d'induction de l'expression relative (ARNm / ARNr 16S) des gènes *arsB* et *ACR3* pour chaque condition de l'expérience au bout de 2 jours d'incubation

Les expressions des gènes *arsB* et *ACR3* sont nettement induites par la présence d'arsenic et cela peu importe la forme inorganique de l'arsenic présente dans les milieux de culture (Tableau 14). Nous pouvons néanmoins remarquer que l'expression du gène *ACR3* est induite d'une manière plus importante que le gène *arsB* dans chaque condition expérimentale. De plus, l'expression de ces deux gènes est plus forte en présence des deux formes d'arsenic à ces concentrations, indiquant une réponse transcriptionnelle dose-dépendante des gènes *arsB* et *ACR3*.

I.4. DISCUSSION

La spécificité des amorces ciblant les gènes *arsB* et *ACR3* a déjà été montrée. Ces amorces permettent d'amplifier des séquences de gènes codant les transporteurs d'As(III) chez des bactéries taxonomiquement différentes (Achour *et al.*, 2007). De nombreuses études environnementales traitant de l'impact de l'arsenic sur la structure et la diversité des communautés bactériennes et utilisant ces couples d'amorces ont déjà été décrites dans la littérature (Bachate *et al.*, 2009 ; Cai *et al.*, 2009 ; Cavalca *et al.*, 2010 ; Corsini *et al.*, 2010 ; Hoeft *et al.*, 2010 ; Sheik *et al.*, 2012). En revanche, elles ne décrivent pas de quantification en temps réel de ces gènes dans des échantillons environnementaux. Il est généralement recommandé de cibler des amplicons dont la taille n'excède pas 300 pb afin d'augmenter l'efficacité de l'amplification par PCR en temps réel. Cependant, nous avons choisi d'optimiser les conditions d'amplification avec les couples d'amorces déjà décrits au lieu de dessiner de nouvelles amorces ciblant un amplicon de plus petite taille. Ce choix s'est avéré fructueux puisque nous sommes parvenus à quantifier des fragments d'environ 750 pb avec des efficacités d'amplification proches de 100 %. De plus, les seuils de détection des amplicons *arsB* et *ACR3* sont faibles tout comme le seuil de détection du gène *aioA*. Dans le cas de ce dernier, l'amplification est voisine de 74 % mais cela ne constitue pas une barrière aux expériences ultérieures (Cebon *et al.*, 2008 ; Quemeneur *et al.*, 2010).

Les résultats de quantification de l'expression des gènes *arsB* et *ACR3* après deux jours d'incubation, lorsque les bactéries étaient en phase exponentielle de croissance, dans les conditions simplifiées de cette expérimentation sont encourageants. En effet, une forte induction de l'expression de ces deux gènes est observée en présence d'arsenic. L'expression des gènes dans les échantillons témoins « sans arsenic » a été considérée comme non-détectable car les quantités d'ADNc correspondants se trouvent sous le seuil de détection de la méthode de PCR en temps réel précédemment mise en place. De plus, la migration des produits PCR sur gel d'agarose a permis de vérifier que les échantillons non rétro-transcrits sont bien négatifs ce qui signifie que les échantillons d'ADNc ne sont pas contaminés par de l'ADN génomique.

L'étude du ratio entre les ADNc des gènes fonctionnels et les ADNc 16S, tel que présenté dans notre travail, donne une information sur l'expression relative de ces gènes dans la communauté bactérienne active. En revanche, d'après Freitag et Prosser (2009), la quantification des gènes et de leurs transcrits permet le calcul des ratios transcrits/gènes, qui correspondent à l'abondance des transcrits par cellule (Sharkey *et al.*, 2004 ; Yun *et al.*, 2006). Cette approche sera utilisée dans la partie suivante traitant de la dynamique d'expression des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans une communauté bactérienne tellurique exposée à différentes concentrations en As(III).

PARTIE II : OUTILS D'ETUDE DE LA REPONSE ADAPTATIVE D'UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE AU Cd, Zn ET Pb

II.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les bactéries disposent de systèmes de détoxification des ETM, qu'il s'agisse d'oligoéléments (Zn, Cu, Ni..) présents en excès ou de métaux/métalloïdes non essentiels (Cd, Pb, As...). Les mécanismes de résistance les plus courants fonctionnent par expulsion du métal hors de la cellule via différentes familles de transporteurs membranaires (ATPases de type P, pompes Resistance Nodulation Division (RND)), maintenant ainsi les concentrations intracellulaires à un niveau sub-toxique. Ces pompes d'efflux présentent des spécificités de substrat restreintes et certaines d'entre elles sont présentes dans de nombreux groupes bactériens. Par ailleurs, les gènes codant ces enzymes sont généralement inductibles et ne sont exprimés que lorsque les concentrations en ETM sont perçues comme toxiques pour les bactéries. Ils constituent donc des cibles privilégiées pour caractériser la réponse adaptative des communautés bactériennes telluriques aux stress métalliques. Dans la partie précédente, nous avons mis en place une méthode de PCR en temps réel ciblant les gènes codant les pompes d'efflux de l'As(III) et l'As(III)-oxydase à partir d'amorces oligonucléotidiques déjà disponibles (Achour *et al.*, 2007 ; Quéméneur *et al.*, 2008 ; Quéméneur *et al.*, 2010). Cette étude vise à cibler les ATPases de type P_i spécifiques du Cd, Zn et Pb (cf § II.2.1. du chap. « Etat de l'art ») (Axelsen et Palmgren, 1998 ; Argüello, 2003 ; Argüello *et al.*, 2007) et, à notre connaissance, aucun couple d'amorces n'a été développé pour cibler spécifiquement ces ATPases de type P_i. Le développement de ces amorces constitue donc le principal objectif de cette partie des résultats pour ensuite étudier la réponse adaptative des communautés bactériennes telluriques au cadmium.

II.2. CONCEPTION D'AMORCES OLIGONUCLEOTIDIQUES CIBLANT LES ATPases DE TYPE P_{1B}

Le choix des séquences de référence utilisées pour concevoir les amorces se justifie par le fait qu'elles couvrent la majorité des phyla procaryotes. En effet, elles codent pour des protéines présentes chez des bactéries appartenant à des groupes taxonomiques variés incluant des protéobactéries, des actinobactéries ou encore des firmicutes. Après un alignement à l'aide du programme CLUSTALW et une identification des régions conservées par Block Maker, des amorces dégénérées ont été conçues à l'aide du programme CoDeHOP. Ces amorces ciblent les motifs cerclés de rouge et d'orange sur la figure 31. Ils correspondent respectivement au motif 4 et à une partie du motif 9 (sur un total de 9 motifs conservés), au sein de la superfamille des ATPases de type P_i spécifiques des ETM (Chan *et al.*, 2010). Les rôles structuraux potentiels de ces deux motifs sont :

- pour le motif 4 : ce motif est associé au quatrième segment transmembranaire (TMS) et il est considéré comme jouant un rôle dominant dans la transduction de l'énergie à travers le transport et la phosphorylation de l'ATP (Moller *et al.*, 1996) ;
- pour le motif 9 formé d'environ 23 acides aminés : il forme une région charnière flexible (« hinge ») qui joint le domaine cytoplasmique au domaine cinquième TMS. Son rôle serait structural ou fonctionnel avec une possible implication dans les changements de conformation de la protéine (Chan *et al.*, 2010).

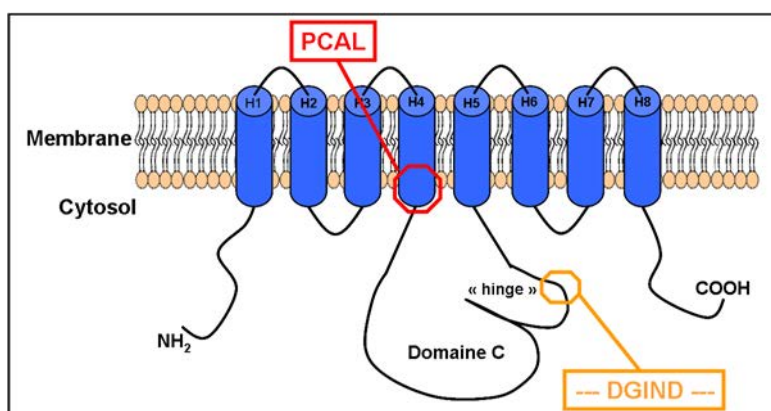


Figure 31 : Principaux domaines structuraux d'une ATPase de type P_i spécifique des ETM (Chan *et al.*, 2010).

Le motif 4 est représenté en rouge et le motif 9 est schématisé en orange clair.

Les séquences protéiques de ces motifs conservés sont représentées dans la figure 32.

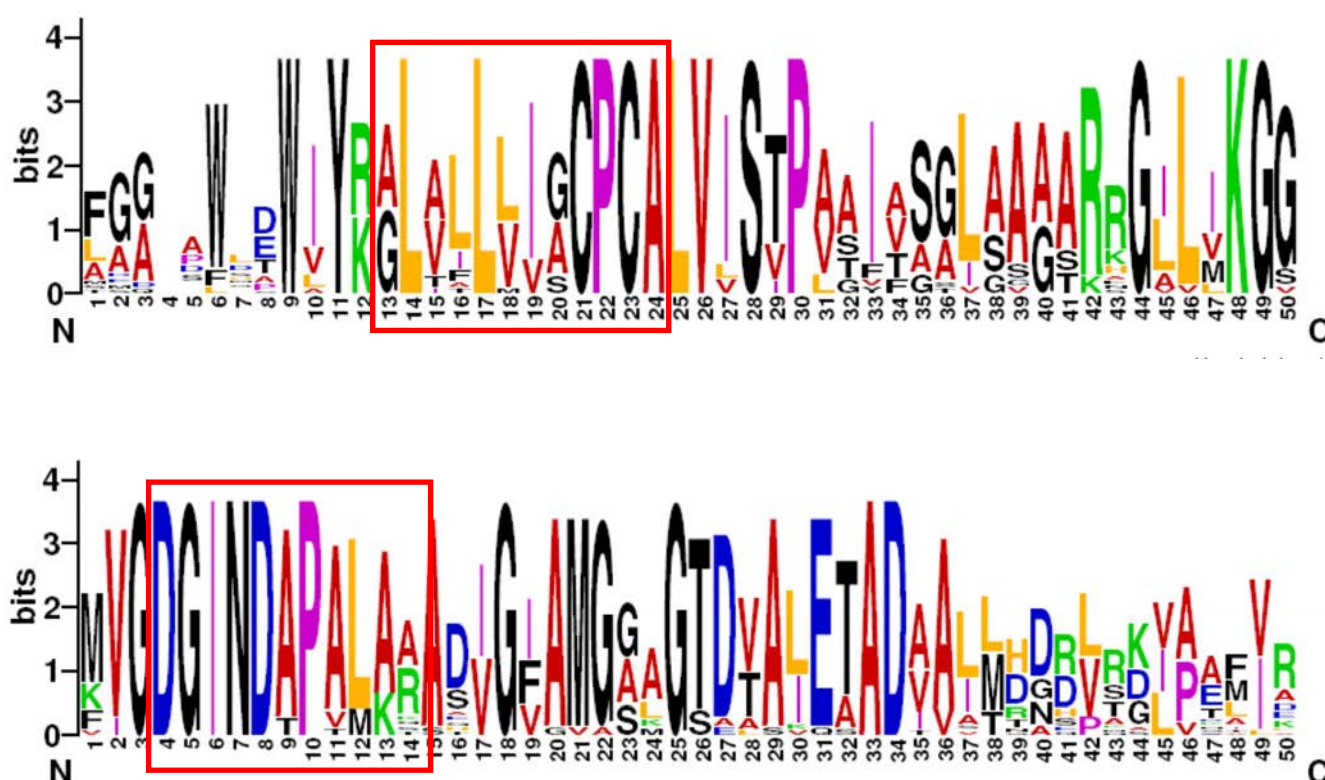


Figure 32 : Représentation « Logo » des vingt séquences d'ATPases de type P_i spécifiques des ETM sélectionnées (créée à l'aide du programme weblogo <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)
Les motifs 4 (en haut) et 9 (en bas) à partir desquels les amorces ont été dessinées sont encadrés.

Dans le cadre de cette étude, trois couples d'amorces ciblant ces motifs (Tableau 11 du chap. « Matériels et Méthodes ») ont été testés. La taille attendue des fragments amplifiés était de 750 pb. Les amorces ATPaseL4-Rev et ATPaseD4-For n'ont pas permis d'amplifier ces gènes donc le paragraphe suivant traite des travaux réalisés à partir des deux autres couples d'amorces oligonucléotidiques.

II.3. RESULTATS

II.3.1. EVALUATION DE LA SPECIFICITE DES AMORCES

Dans un premier temps, la spécificité de deux couples d'amorces a été évaluée sur de l'ADN génomique provenant de plusieurs souches de référence possédant le gène cible comme *E. coli* et *Shewanella frigidimarina*. Les souches *E. coli* JW3434 délétée du gène *zntA* et *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, dépourvue d'ATPase de type P (d'après une recherche d'homologie dans le génome séquencé) ont été utilisées comme contrôles négatifs.

Les réactions de PCR réalisées avec le premier couple d'amorces CadD1-For et CadL5-Rev permettent d'amplifier un fragment de la taille attendue (environ 750 pb) pour la majorité des souches sauf pour *E. coli* TOP 10 et *E. coli* JW3469, pour lesquelles un fragment d'environ 1,2 kb est obtenu (Figure 33). Une analyse détaillée de la séquence du gène *zntA* d'*E. coli* indique la présence d'un site potentiel d'hybridation de l'amorce CadD1-For à 500 pb en 5' de la séquence cible, ce qui permettrait d'expliquer l'obtention de ce produit PCR aspécifique.

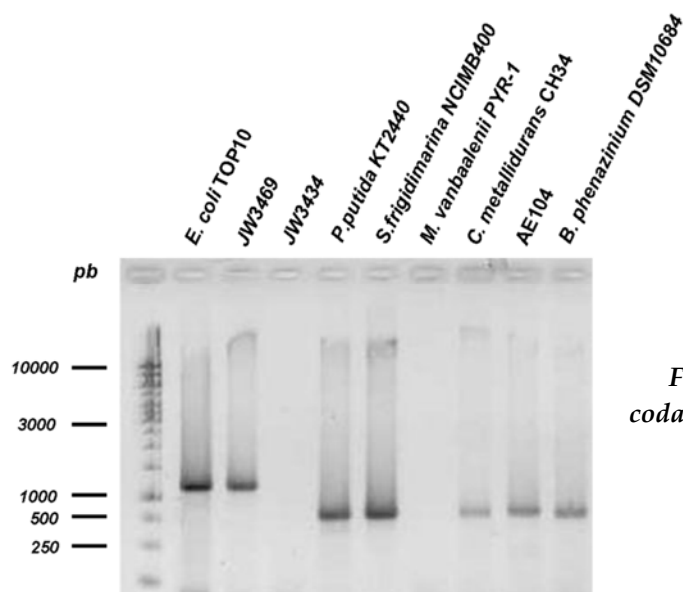


Figure 33 : Résultats de la PCR ciblant les gènes codant les ATPases de type P_i avec les amorces CadD1-For et CadL5-Rev

C'est pour cette raison qu'un autre couple d'amorces (ATPaseD3-For / ATPaseL4-Rev) a été dessiné et testé sur ces ADN génomiques. Ces amorces sont plus longues (37 nucléotides) que les amorces précédentes (23 nucléotides) et se fixent également sur les sites « motif 4 » et « motif 9 ». L'objectif de tester des amorces plus longues était d'augmenter la spécificité de l'amplification.

La figure 34 présente l'amplification d'un produit PCR de taille attendue pour chacune des souches possédant le gène cible, y compris *E. coli*. Cependant, une faible amplification est également observée pour la souche JW3434 ($\Delta zntA$). Le séquençage de ce produit PCR nous a révélé qu'il s'agit du gène *copA*, codant une ATPase de type P transportant le cuivre et l'argent. Ainsi, ce couple d'amorces permet d'amplifier les ATPases de type P_i spécifiques du cadmium, zinc et plomb mais aussi d'autres ATPases de type P_i spécifiques du cuivre. Ce couple d'amorce a donc été retenu pour les expériences suivantes.

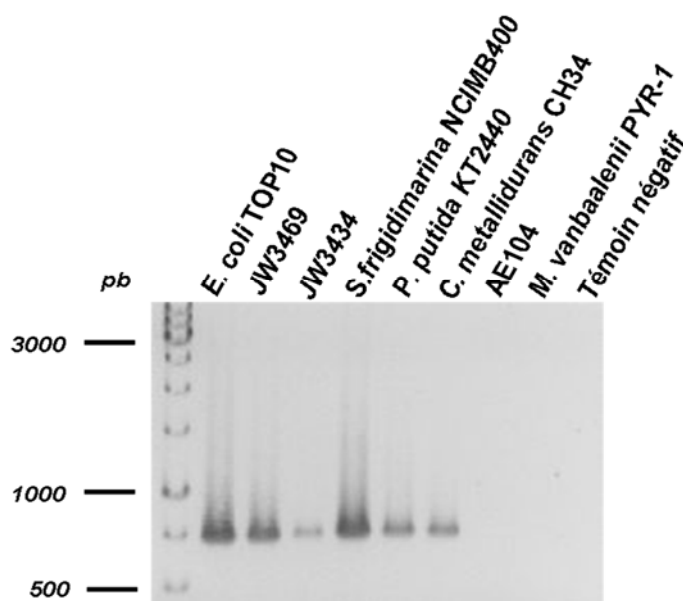


Figure 34 : Résultats de la PCR ciblant les gènes codant pour les ATPases de type P_1 avec les amorces ATPaseD3-For et ATPaseL4-Rev

II.3.2. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DES AMORCES SUR UNE BANQUE D'ADN METAGENOMIQUE

II.3.2.1. Clonage - séquençage de l'amplicon

L'amplification par PCR à partir d'ADN métagénomique du sol HAR8 pollué à l'arsenic et au plomb (Hargarten les Mines, 57) a également généré un fragment de taille attendue, qui a été extrait du gel d'agarose puis cloné dans le vecteur pCR2.1. La présence d'un insert a été testée par PCR sur 28 colonies (Figure 35). Les résultats indiquent que 23 clones contiennent un insert d'une taille proche de celle du fragment d'ADN cible c'est-à-dire environ 750 pb.

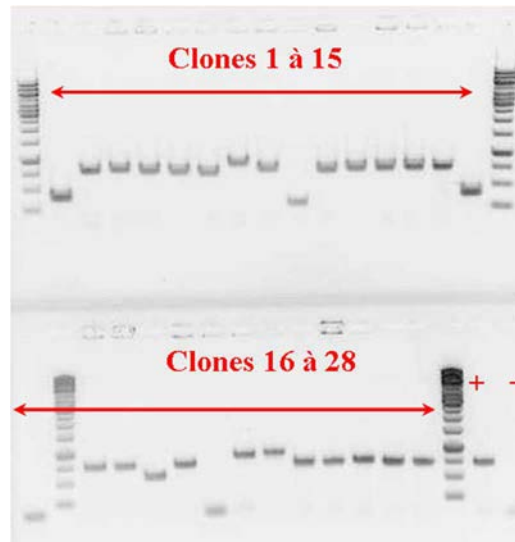


Figure 35 : Résultats de la PCR sur colonies ciblant les gènes codant pour les ATPases de type P_i

Le séquençage de ces 23 clones a confirmé, en partie, la spécificité des amorces puisque 16 séquences différentes se sont révélées coder pour des ATPases de type P_i . Elles ont ensuite été comparées aux données disponibles dans la base de données Genbank. Pour chaque séquence, le tableau 15 indique le nom de la bactérie possédant la séquence homologue la plus proche et son numéro d'accèsion, la similarité (pourcentage d'identité en acides aminés) et la classe (ou phylum) à laquelle elle appartient. Les séquences obtenues ont été comparées entre elles et 7 séquences présentaient des similarités supérieures à 95 % avec les séquences répertoriées dans le tableau 15, ce qui nous amène à 16 séquences différentes.

Clone ID	Voisin caractérisé le plus proche	Protéine caractérisée la plus proche (No. accession)	Identité (%)	Affiliation taxonomique (classe ou phylum)
HAR8-A	<i>Caldithrix abyssi</i> DSM 13497	Heavy metal translocating P-type ATPase (ZP_09549213)	59	Euryarchaeota
HAR8-D	<i>Rhodopirellula europaea</i> 6C	heavy metal translocating P-type ATPase (ZP_21770744)	64	
HAR8-B	<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797	cadmium-transporting ATPase (ZP_01854212)	56	Planctomycetes
HAR8-F	<i>Sinorhizobium meliloti</i> GR4	Copper (or silver) translocating P-type ATPase (YP_007192076)	51	
HAR8-H	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3	copper-translocating P-type ATPase (ZP_05033035)	54	
HAR8-O	<i>Chelativorans</i> sp. BNC1	heavy metal translocating P-type ATPase (YP_665836)	92	α -proteobacteria
HAR8-P	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting P-type ATPase (YP_001243187)	82	
HAR8-G	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255	heavy metal translocating P-type ATPase (YP_319733)	74	
HAR8-C	<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257	Cation transporting P-type ATPase SilP (YP_006399266)	63	
HAR8-K	<i>Thiomonas</i> sp. 3As	Copper-transporting P-type ATPase (YP_003625487)	63	β -proteobacteria
HAR8-N	<i>Ralstonia</i> sp. 5_7_47FAA	Cadmium exporting ATPase (ZP_07673452)	92	
HAR8-L	<i>Desulfomicrobium baculatum</i> DSM 4028	Heavy metal translocating P-type ATPase (YP_003157517)	58	δ -proteobacteria
HAR8-J	<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting P-type ATPase (ZP_006117255)	93	γ -proteobacteria
HAR8-I	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGr7	heavy metal translocating P-type ATPase (YP_002514578)	52	
HAR8-E	<i>Opitutus terrae</i> PB90-1	Heavy metal translocating P-type ATPase (YP_001821322)	64	Verrucomicrobia
HAR8-M	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> T-27	cation-transporting P-type ATPase (YP_002762415)	52	Gemmatimonadetes

Tableau 15 : Diversité des séquences protéiques (Blastx) amplifiées par PCR à partir de l'ADN métagénomique HAR8

II.3.2.2. Arbre phylogénétique des ATPases de type P_{1B}

L'arbre phylogénétique, présenté en figure 36, a été construit par le logiciel MEGA 4.0 à partir des séquences protéiques de référence, des séquences protéiques déduites des séquences clonées (ExPASy / outil de traduction des séquences d'ADN) et des séquences homologues voisines. Nous avons remarqué que les séquences obtenues à partir de sol proviennent de bactéries diversifiées d'un point de vue taxonomique, ce qui répond pour partie à l'objectif initial qui était de dessiner des amorces spécifiques des ATPases de type P_i mais permettant l'amplification de séquences issues d'une grande variété de taxons bactériens. Nous pouvons noter que de nombreuses valeurs de bootstrap, calculées à partir de 10000 réplicats, sont faibles donc l'arbre phylogénétique n'est pas très robuste ce qui est généralement la conséquence d'erreurs du jeu de données *via* le séquençage et/ou les alignements. Néanmoins, il est notable que les 16 séquences protéiques traduites à partir de l'ADN métagénomique ne sont pas similaires entre elles, mises à part HAR8-F et HAR8-H ainsi que HAR8-I et HAR8-O. De plus, de nombreuses séquences ne sont pas affiliées à des genres particuliers. En revanche, nous ne pouvons pas assurer que les séquences les plus similaires sont les plus apparentées, puisque nous ne connaissons pas la vitesse d'évolution de ces séquences.

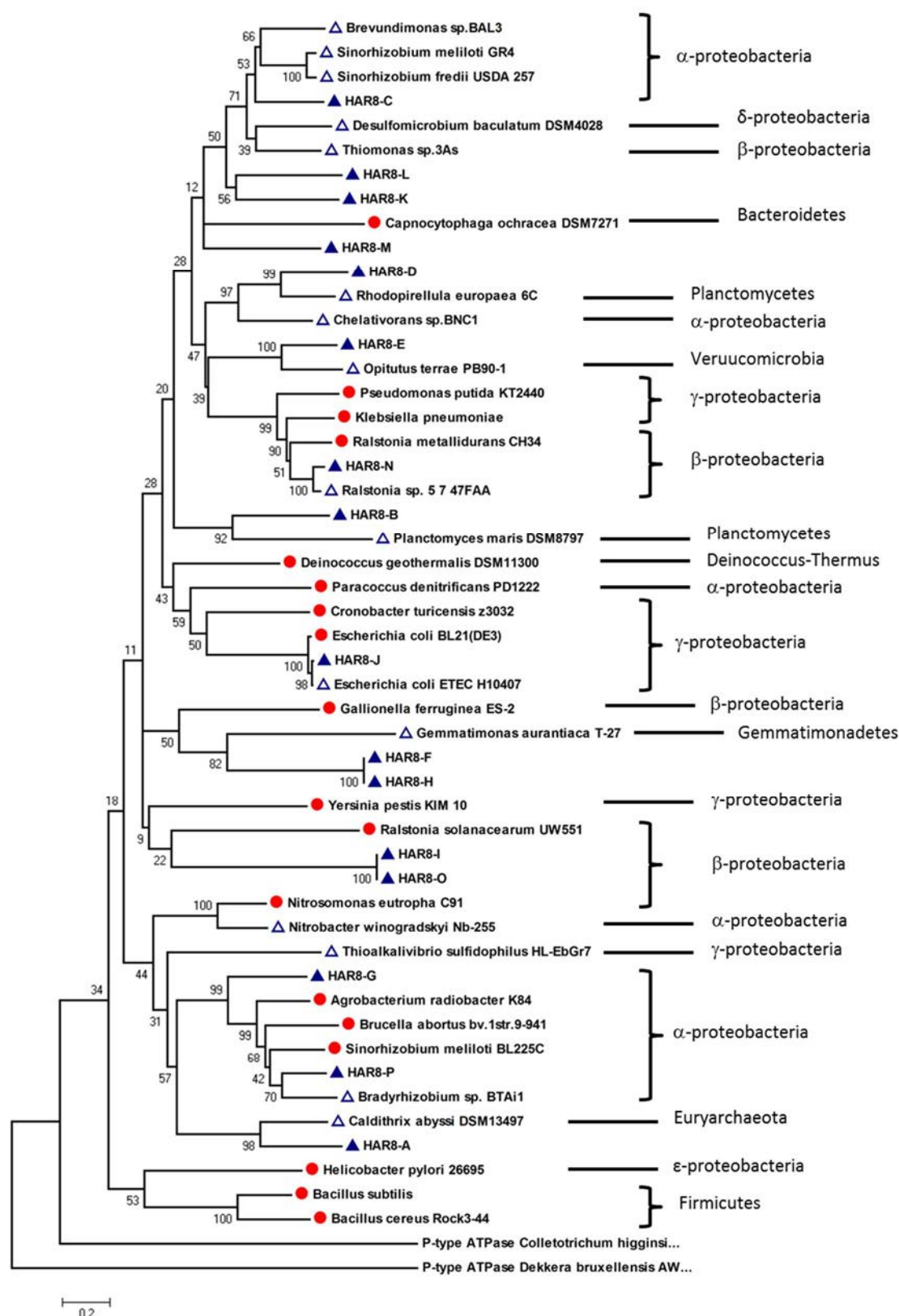


Figure 36 : Diversité des ATPases de type P_i dans la banque métagénomique HAR8. (Arbre phylogénétique Neighbor-Joining enraciné construit avec le logiciel Mega 4.0). L'arbre a été construit sur les acides aminés. Les séquences protéiques utilisées pour dessiner les amorces sont représentées par les cercles rouges, les séquences protéiques obtenues à partir de l'ADN métagénomique par les triangles pleins bleus et les séquences voisines les plus proches par les triangles vides bleus. Les valeurs de bootstrap ont été calculées à partir de 10000 répliquats et sont reportées sur chaque nœud. L'échelle représente 20 % de divergence des séquences.

II.3.3. DIVERSITE DES ATPases DE TYPE P_{IB} DANS DEUX SOLS POLLUES

Après avoir vérifié la spécificité des amorces ATPaseD3-For et ATPaseL4-Rev sur la banque d'ADN génomique HAR8, nous avons étudié la diversité des gènes codant les ATPases de type P_i dans le sol NM-MS d'Homécourt et le sol 9 d'Auzon. Ces deux sols sont fortement pollués en plomb et en cuivre pour l'un (Sol 9 : Pb ($8170 \pm 311 \mu\text{g/g}$), Zn ($186 \pm 11 \mu\text{g/g}$) et Cu ($628 \pm 7 \mu\text{g/g}$)) et en plomb et en zinc pour l'autre (sol NM : Cd ($2,8 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$), Cu ($136 \pm 7 \mu\text{g/g}$), Pb ($596 \pm 127 \mu\text{g/g}$) et Zn ($2279 \pm 182 \mu\text{g/g}$)).

Les séquences obtenues ont là aussi été comparées entre elles et avec celles disponibles dans la base de données Genbank. Pour chaque séquence, le tableau 16 indique le nom de la bactérie possédant la séquence protéique homologue la plus proche et son numéro d'accession, la similarité (pourcentage d'identité en acides aminés) et la classe (ou phylum) à laquelle elle appartient. A partir de l'arbre phylogénétique, présenté dans la figure 37, nous avons constaté une grande diversité taxonomique des séquences protéiques d'ATPases de type P_i dans ces sols, tout comme dans l'ADN métagénomique HAR8. Dans ce cas là aussi, les valeurs de bootstrap ne sont pas élevées et les séquences ne sont pas affiliées à des genres particuliers.

Le second élément notable est la faible divergence observée entre des séquences appartenant à des phyla différents, par exemple, la divergence entre les séquences de *Ralstonia metallidurans* CH34 (β -proteobacteria) et *Klebsiella pneumoniae* (γ -proteobacteria), groupement soutenu par une valeur de bootstrap égale à 70. De la même manière, la séquence de *Pseudomonas putida* KT2440 est proche de ce groupe précédent avec une valeur de bootstrap égale à 53. Un autre groupement est remarqué entre le phylum des α -proteobacteria et *Deinococcus geothermalis* (Deinococcus-Thermus) ainsi que *Nitrosomonas eutropha* (β -proteobacteria). A cela peut s'ajouter le rapprochement du cluster *Rhodopirellula* (Planctomycetes) avec le cluster *Sphingomonas* (α -proteobacteria) et surtout la position des séquences issues d'Archaea.

Clone ID	Voisin caractérisé le plus proche	Protéine caractérisée la plus proche (No. accession)	Identité (%)	Affiliation taxonomique (classe ou phylum)
CAD1-MS-T11	<i>Sphingomonas</i> sp.S17	Cadmium-translocating P-type ATPase (ZP_08389825)	60	α-proteobacteria
CAD4-MS-T11	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. vicial WSM1455	Heavy metal P-type ATPase, Cd/Co/Hg/Pb/Zn – transporting (ZP_18296166)	64	
CAD13-MS-T11	<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255	Heavy metal translocating P-type ATPase (YP_319733)	64	
CAD14-MS-T11	<i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting P-type ATPase (YP_001243042)	79	
CAD16-MS-T11	<i>Rhodovulum</i> sp. PH10	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting P-type ATPase (YP_10898835)	59	
CAD5-Sol9	<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	Putative cation transporting P-type ATPase (YP_005192706)	62	
CAD6-Sol9	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM1253	Copper/silver-traslocating P-type ATPase	83	β-proteobacteria
CAD6-MS-T11	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	cation translocating P-type ATPase (YP_0011353486)	59	
CAD18-MS-T11	<i>Tauera</i> sp. MZ1T	ATPase P (YP_002355740)	81	
CAD4-Sol9	<i>Sulfuricella denitrificans</i> skB26	Copper-translocating P-type ATPase (ZP_10380956)	66	γ-proteobacteria
CAD7-Sol9	<i>Rhodanobacter</i> sp. 115	Heavy metal translocating P-type ATPase (ZP_10192239)	78	
CAD15-MS-T11	<i>Clostridium botulinum</i> CFSAN001627	Copper-translocating P-type ATPase (ZP_16272128)	57	
CAD1-Sol9	<i>Mahella australiensis</i> 50-1 BON	Heavy metal translocating P-type ATPase (YP_004463259)	45	Firmicutes
CAD17-MS-T11	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DSM15978	Heavy metal translocating P-type ATPase, Cd/Co/Hg/Pb/Zn – transporting (YP_007313011)	66	
CAD10-MS-T11	<i>Aeropyrum pernix</i> K1	cation-transporting ATPase (NP_147955)	38	
CAD3-MS-T11 et CAD9-MS-T11	<i>Rhodopirellula europea</i> 6C	Heavy metal P-type ATPase (ZP_21770744)	65	Planctomycetes
CAD11-MS-T11	Uncultured bacterium	Copper-translocating P-type ATPase (AF_560417)	61	

Tableau 16 : Diversité des séquences (Blastx) amplifiées par PCR à partir de l'ADN du sol NM au temps T11 (CAD...-MS-T11) et du sol 9 d'Auzon (CAD...-Sol9)

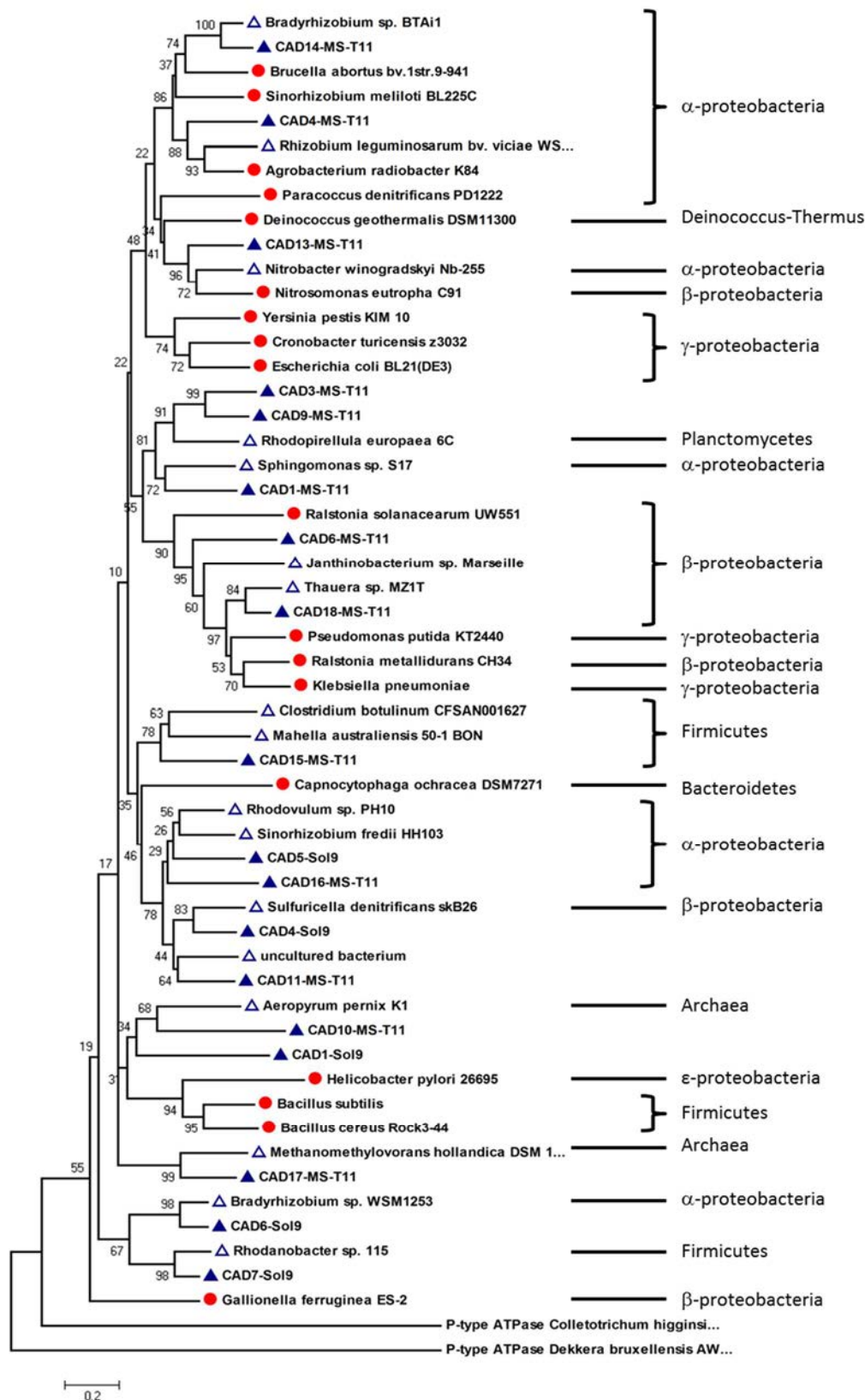


Figure 37 : Diversité des ATPases de type P_i dans l'ADN extrait des sols NM-MS au temps T11 et du sol 9 d'Auzon. (Arbre phylogénétique Neighbor-Joining enraciné construit avec le logiciel Mega 4.0). L'arbre a été construit sur les acides aminés. Les séquences protéiques utilisées pour dessiner les amorces sont représentées par les cercles rouges, les séquences protéiques obtenues à partir de l'ADN métagénomique par les triangles pleins bleus et les séquences voisines les plus proches par les triangles vides bleus. Les valeurs de bootstrap ont été calculées à partir de 10000 réplicats et sont reportées sur chaque nœud. L'échelle représente 20 % de divergence des séquences.

II.4. DISCUSSION

Contrairement aux autres sous-familles d'ATPases de type P, les ATPases de type P_i sont présentes dans tous les règnes du vivant, des archées extrêmophiles à l'Homme (Argüello, 2003 ; Argüello *et al.*, 2007). Il serait donc légitime de penser que les séquences protéiques utilisées pour dessiner les amorces dégénérées ne sont pas assez nombreuses pour couvrir cette vaste diversité. Néanmoins, les séquences amplifiées à partir de l'ADN provenant de trois sols pollués représentent une large gamme de taxons microbiens comme en témoignent les arbres phylogénétiques. Les ATPases de type P_i ont été initialement identifiées chez des organismes procaryotes, tels que dans le plasmide pI258 de *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al.*, 1989), *Enterococcus hirae* (Odermatt *et al.*, 1993) et *Rhizobium meliloti* (Kahn *et al.*, 1989), ce dernier correspondant à l'affiliation la plus proche d'une séquence retrouvée dans l'ADN de la banque métagénomique HAR8.

De plus, le séquençage des gènes amplifiés à l'aide de nos amorces rapporte des séquences protéiques voisines de celles des archaebactéries *Methanomethylovorans hollandica* DSM15978, *Aeropyrum pernix* K1 ou encore *Caldithrix abyssi* DSM 13497. Ce résultat est encourageant dans la mesure où aucune séquence protéique d'archées ne figurait dans les séquences de référence utilisées pour dessiner ces amorces. Ceci est un argument supplémentaire quant à la pertinence et la spécificité des amorces ATPaseD3-Rev et ATPaseL4-For, sachant que les ATPases de type P_i sont retrouvées dans de nombreux génomes connus d'archées (Argüello, 2003 ; Chan *et al.*, 2010). De plus, des séquences protéiques sont similaires à des séquences retrouvées chez des planctomycètes, des verrucomicrobia, des gemmatimonadetes ont été obtenues. Ce travail met donc en évidence une large diversité environnementale et les amorces testées ont un large spectre.

En ce qui concerne la robustesse de l'arbre, les valeurs de bootstrap ne sont pas très élevées. Néanmoins, il s'agit de l'étude de la diversité de gènes fonctionnels et des valeurs de cette ordre de grandeur ($\leq 50-75$) sont retrouvées pour d'autres gènes fonctionnels : c'est, par exemple, le cas pour les arbres réalisés à partir des séquences protéiques de AioA (Quéménéur *et al.*, 2008 ; 2010), de la sous-unité α des HAP-dioxygénases (Cebon *et al.*, 2008) ou encore des protéines présentes chez les méthanotrophes et les méthylotrophes (McDonald et Murrel, 1997 ; Nercessian *et al.*, 2005). De plus, ces valeurs de bootstrap nous conduisent

également à soupçonner des transferts de gènes. En effet, d'une manière plus générale, ces gènes sont indispensables à ces organismes pour maintenir les concentrations intracellulaires en ETM à un niveau subtoxique, donc indispensables pour le développement bactérien dans des sols extrêmement pollués en Cd, Zn, Pb et Cu. Il est donc envisageable que les bactéries subissent une forte pression et sont amenées à transférer de manière horizontale les gènes codant ces protéines (Coombs et Barkay, 2004). En effet, le rôle du transfert horizontal dans l'évolution devient de plus en plus apparent après chaque séquençage et annotation de nouveaux génomes bactériens (Coombs et Barkay, 2004 ; Martinez *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus dans ces expériences semblent indiquer qu'il n'existe pas de congruence entre la phylogénie bactérienne déduite des séquences d'ARNr 16S et la phylogénie des ATPases de type P présentes chez des bactéries connues. Il serait pertinent de vérifier cette hypothèse en identifiant les bactéries possédant les gènes détectés dans cette étude afin de comparer les phylogénies. Il est probable que cette approche mette en évidence de nombreuses irrégularités et donc un transfert horizontal de ces gènes.

Ainsi, du fait de leur capacité à cibler des gènes d'ATPase très divergents, ces amorces pourront être utilisées à l'avenir pour étudier la diversité des ATPases de type P_i procaryotes dans des échantillons environnementaux. Néanmoins, les amorces dessinées à partir d'ATPases de la famille 6 dans le cadre de cette étude semblent cibler également les ATPases de type P_i spécifiques du cuivre, donc appartenant à la famille 5 selon Chan *et al.* (2010). Cette observation peut s'expliquer par le fait que les familles 5 et 6 des ATPases de type P_i partagent le motif 4 PCAL, à la différence des autres familles, mais également la partie du motif 9 DGIND (Chan *et al.*, 2010). Au moment de la conception des amorces oligonucléotidiques, en 2009, aucune donnée de la littérature ne permettait de le savoir et une perspective à ce travail de thèse sera donc de dessiner de nouvelles amorces ciblant la famille 6 à partir de séquences bien conservées dans d'autres motifs et/ou de poursuivre le développement de la quantification par PCR en temps réel de ces gènes avec les amorces dessinées au cours de cette étude.

PARTIE III : DYNAMIQUE D'EXPRESSION DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* DANS UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE TELLURIQUE EXPOSEE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN ARSENIC

III.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.1.1.1. de l'état de l'art, de nombreuses études ont été menées sur la régulation de l'expression des opérons *ars*, notamment par RT-PCR en temps réel ou encore à l'aide de gènes rapporteurs. Cependant, la plupart ont été menées sur des microorganismes modèles en cultures pures et, rares sont les études portant sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'arsenic dans des échantillons naturels, probablement en raison du verrou technique représenté par l'extraction des ARNm environnementaux, notamment à partir de sol. Malasarn *et al.* (2004) ont mis en évidence un lien entre l'expression du gène *arrA* codant une sous-unité de l'As(V)-réductase respiratoire de *Shewanella* sp. ANA-3 et l'activité de respiration de l'As(V) de cette bactérie, à partir d'une préparation d'hydroxydes de fer (Fe(OH)₃) saturés par de l'As(V). Les auteurs ont également étudié, à l'aide d'amorces dégénérées, la diversité des gènes *aioA* à partir d'ADN et d'ARN extraits de sédiments anaérobies contaminés par l'arsenic. En 2009, Hamamura *et al.* sont parvenus à montrer l'expression des gènes *aioA* à partir de sédiments en contact avec des eaux géothermales contaminées à l'arsenic dans lesquelles l'As(III) est fortement oxydé.

Dans cette expérience, nous nous sommes fixés pour objectif de caractériser l'abondance et l'expression des gènes de résistance (*arsB*, *ACR3*) et d'oxydation de l'arsenic (*aioA*) au sein d'une communauté bactérienne exposée à des concentrations croissantes d'As(III) dans des cultures en batch. Cette étude visait à déterminer si une corrélation entre l'abondance relative des gènes cibles et/ou de leurs transcrits et la concentration en As(III) existe, mais également à appréhender la dynamique temporelle d'expression de ces gènes cibles. Cette démarche expérimentale était aussi susceptible de révéler l'existence de liens entre la diversité des bactéries actives et le niveau de contamination par l'arsenic. Enfin, d'un point de vue méthodologique, cette expérience permettait de tester la méthode de co-extraction ADN / ARN mise en place et de vérifier sa sensibilité et sa robustesse.

III.2. DEMARCHE EXPERIMENTALE

Une communauté bactérienne, extraite du sol de la friche industrielle de Neuves-Maisons par centrifugation en gradient de densité (§ II.1.1. du Matériel et Méthodes), a été inoculée dans 35 ml de milieu Bushnell Haas, additionnés de 0,4 % de glucose et de 150 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de cycloheximide. Ces cultures bactériennes ont été incubées pendant une semaine en présence de différentes concentrations d'arsénite de sodium : 10 μM , 100 μM , 1 mM et 10 mM. Cette expérience a été réalisée avec trois réplicats, sauf pour les cinq témoins abiotiques qui possédaient chacun une concentration en As(III) différente. La démarche expérimentale est schématisée dans la figure 38 et les prélèvements ont été effectués après 2 j, 3 j, 5 j, et 7 j d'incubation. Nous avons suivi les paramètres physico-chimiques des cultures bactériennes (pH, glucose, arsenic total, As(V)), l'évolution du nombre de copies des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* et des gènes codant l'ARNr 16S, ainsi que leurs expressions respectives au sein de la communauté.

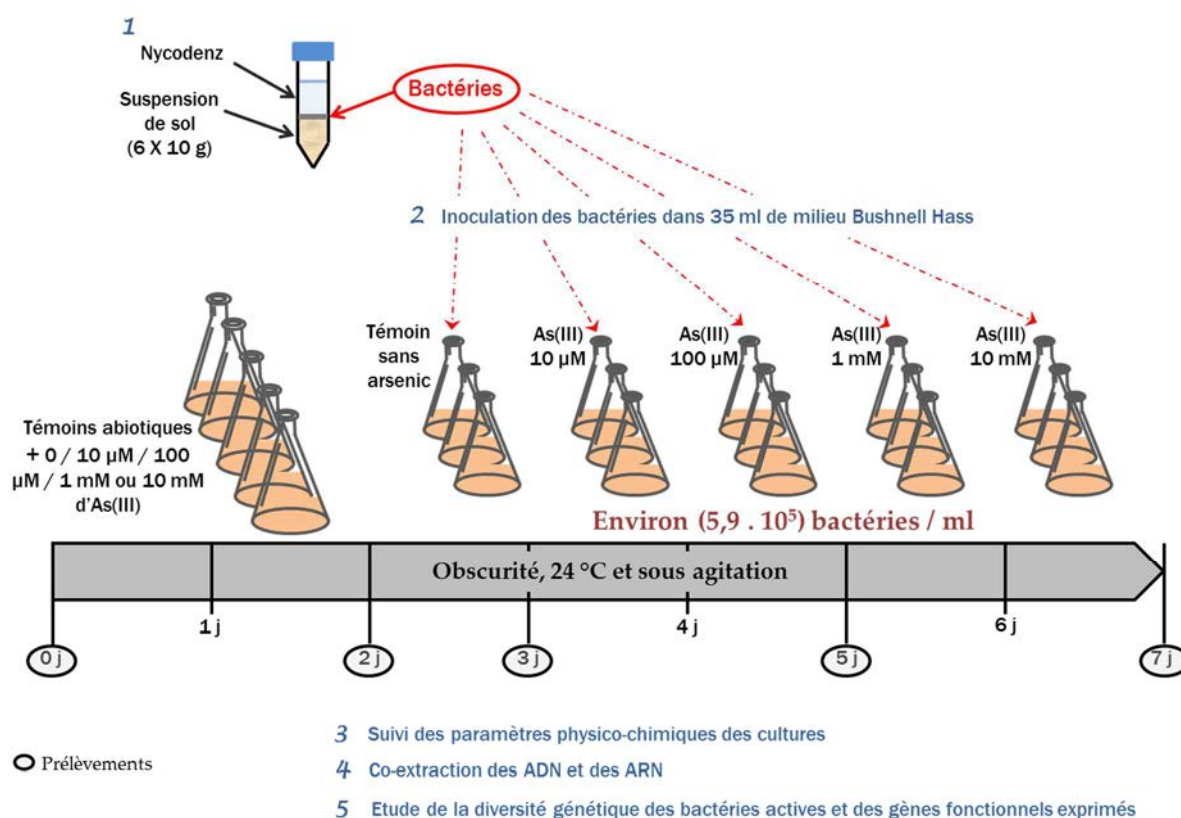


Figure 38 : Démarche expérimentale mise en place pour étudier la réponse d'une communauté bactérienne à un gradient de concentration en As(III)

III.3. RESULTATS

III.3.1. SUIVI DES PARAMETRES DES CULTURES

III.3.1.1. Evolution de la densité optique au cours du

temps

La figure 39 représente l'évolution de la densité optique à 600 nm dans chacun des dispositifs en batch. La croissance bactérienne n'est pas affectée par la concentration en As(III) la plus faible. En effet, les bactéries se développent de la même manière en présence de 10 μ M d'As(III) que les bactéries inoculées en absence d'arsenic. Les concentrations supérieures s'avèrent toxiques, ce qui se traduit par une croissance bactérienne plus lente durant les premiers jours d'incubation en présence de 100 μ M et 1 mM d'As(III). La plus forte concentration de 10 mM d'As(III) entraîne un retard de croissance plus important, avec un début de la division cellulaire après deux jours d'incubation à 24°C. Après 5 jours d'incubation, toutes les cultures atteignent une phase stationnaire, certainement due à un épuisement des nutriments, suivie d'une phase de déclin à 7 jours.

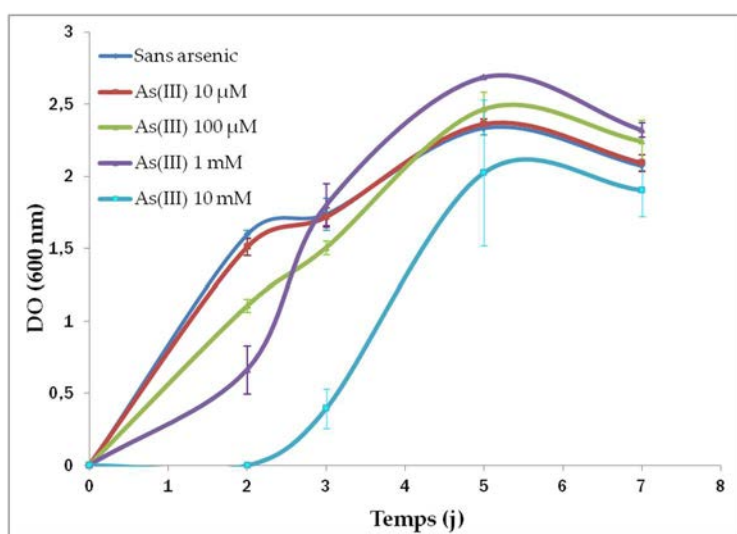


Figure 39 : Croissance des cultures bactériennes en présence de différentes concentrations en As(III) (0, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM et 10 mM) pendant 7 j d'incubation

III.3.1.2. Evolution du pH

La figure 40 représente l'évolution du pH des milieux de culture dans les batchs contenant les bactéries et également dans les différents témoins abiotiques. Une chute d'environ 2 à 3 unités de pH est observée durant les trois premiers jours d'incubation en absence d'As(III),

ainsi que pour les trois plus faibles concentrations c'est-à-dire 10 μ M, 100 μ M et 1 mM d'As(III). Elle est suivie d'une remontée de 0,5 à 1 unité de pH et/ou d'une stabilisation à des valeurs comprises entre pH 5 et pH 6,2. Pour la condition 10 mM As(III), la chute du pH commence seulement après 3 jours d'incubation pour atteindre une valeur voisine de 5,7 en fin d'incubation. En ce qui concerne les témoins abiotiques, le pH n'évolue pas au cours du temps et reste proche de 7,7.

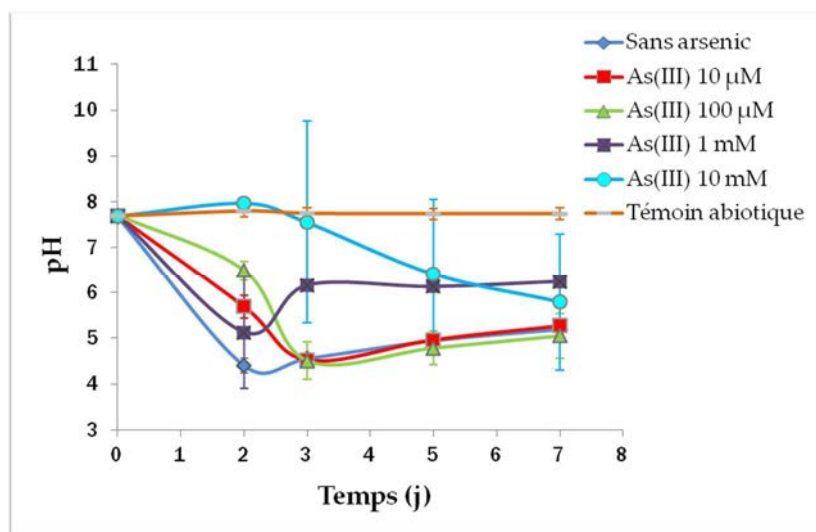


Figure 40 : Evolution du pH dans les cultures-batch

III.3.1.3. Consommation du glucose

La figure 41 représente l'évolution de la concentration en glucose dans les milieux de culture au cours des 7 jours d'incubation et pour chaque condition expérimentale. Nous pouvons remarquer que les courbes d'évolution du glucose et du pH (figure 40) suivent la même tendance et sont à mettre en relation avec la croissance bactérienne (§ II.2.2.1 de cette partie). La totalité du glucose est consommée après 3 jours d'incubation dans tous les cas, sauf pour les cultures en présence de 10 mM d'As(III), dont la croissance débute plus tardivement (Figure 39) et au sein desquelles des différences sont notables entre les trois réplicats en termes de croissance (Figure 39), d'évolution du pH (Figure 40) mais également de consommation du glucose (Figure 41). De la même manière que pour l'évolution du pH, la concentration en glucose dans le témoin abiotique reste stable et proche de la concentration initiale de 0,4 %.

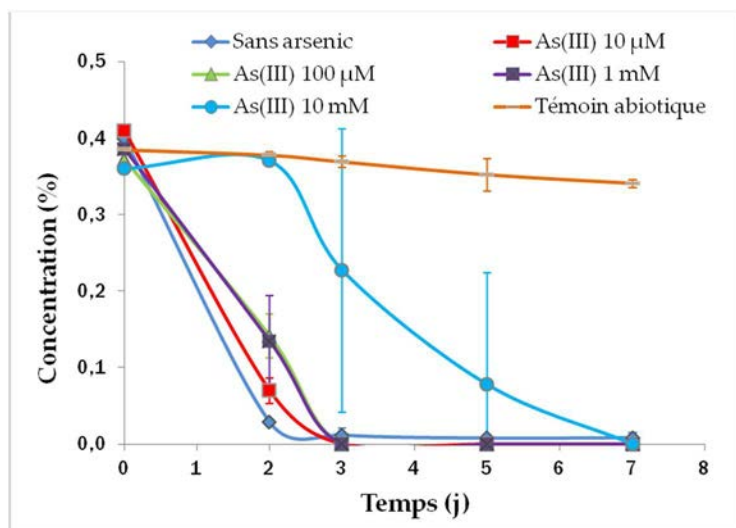


Figure 41 : Evolution de la concentration en glucose dans les cultures-batch

III.3.1.4. Oxydation de l'arsénite

L'évolution de la concentration en As(V) au cours des 7 jours d'incubation est présentée dans la figure 42. Nous observons une apparition d'As(V) dans l'ensemble des batchs inoculés, indiquant des processus d'oxydation de l'As(III). Les concentrations en As(V) atteignent en moyenne 0,009 mM, 0,045 mM, et 1,098 mM dans les cultures-batch « As(III) 10 µM », « As(III) 100 µM », et « As(III) 1 mM », respectivement, et sont nulles dans les témoins abiotiques. Ainsi, la totalité de l'As(III) a été oxydé dans ces trois conditions. En revanche, le dosage d'As(V) pour la condition 10 mM a montré que les trois réplicats présentaient des activités d'oxydation très différentes avec des concentrations respectives de 2,68, 1,18 et 0,12 mM d'As(V) en fin d'incubation. Ces variations ne sont certainement pas dues à des erreurs de dosage en chromatographie ionique puisque les mesures d'As(V) entre réplicats sont reproductibles pour les autres conditions.

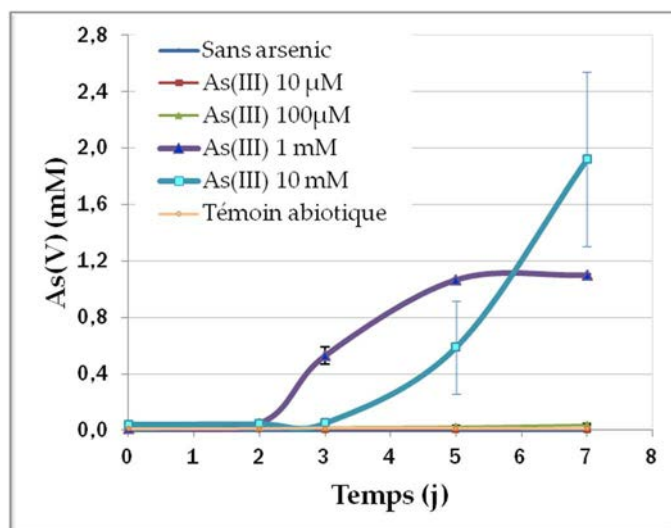


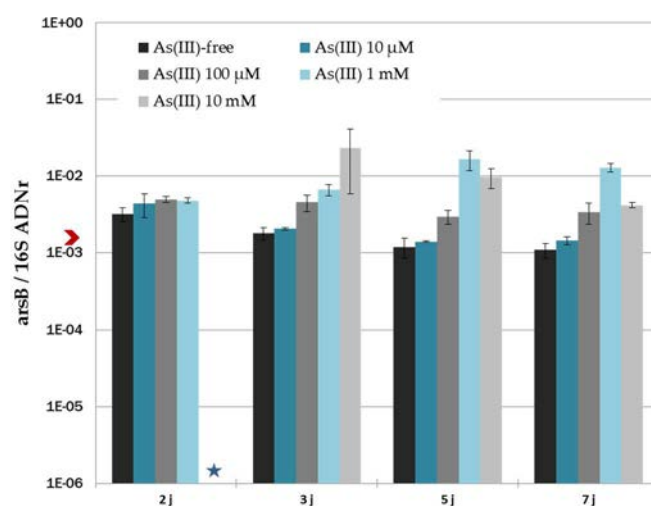
Figure 42 : Evolution de la concentration en As(V) dans les cultures-batch

III.3.2. ABONDANCE DES GENES CODANT LES TRANSPORTEURS D'As(III) ET LES As(III)-OXYDASES

Nous pouvons préciser que le gène ADNr16S est plus abondant dans les cultures contenant 1 mM d'As(III) ($p < 0,0001$), avec des valeurs équivalentes dans celles contenant 10 mM d'As(III). Sur l'ensemble des conditions, cette abondance tend à diminuer avec le temps ($p < 0,0001$).

III.3.2.1. Abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3*

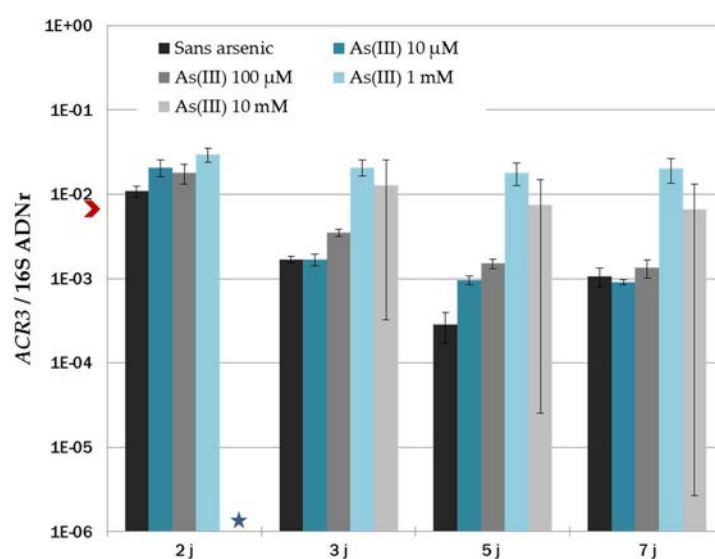
La quantification des gènes *arsB* et *ACR3* donne une indication sur le nombre de bactéries possédant ces gènes. Afin de normaliser les résultats, nous présentons dans la figure 43 l'évolution du ratio entre le nombre de copies du gène *arsB* et le nombre de copies du gène codant l'ARNr 16S (ratio *arsB*/ADNr 16S) qui correspond à la proportion relative de bactéries portant ce gène dans la communauté bactérienne. De même, la figure 44 présente l'évolution de l'abondance relative du gène *ACR3* (ratio *ACR3*/ADNr 16S).



Facteur	p- valeur	Effet			
Concentration	< 0,0001	Sans arsenic (b)	10 µM (b)	100 µM (b)	1 mM (a)
Temps	0,373				

Figure 43 : Abondance relative du gène arsB dans les cultures au cours du temps.

La flèche rouge sur l'axe des ordonnées représente l'abondance relative du gène arsB au temps initial (inoculum). L'étoile signifie que ce gène n'a pas été détecté. Le tableau présente les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de l'interaction des deux facteurs n'a été observé. Les lettres entre parenthèses correspondent aux groupes issus du test de Neuman-Keuls.



Facteur	p- valeur	Effet			
Concentration	< 0,0001	Sans arsenic (b)	10 µM (b)	100 µM (b)	1 mM (a)
Temps	< 0,0001	T1 (a)	T2 (b)	T3 (b)	T4 (b)

Figure 44 : Abondance relative du gène ACR3 dans les cultures au cours du temps.

La flèche rouge sur l'axe des ordonnées représente l'abondance relative du gène ACR3 au temps initial (inoculum). L'étoile signifie que ce gène n'a pas été détecté. Le tableau présente les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de l'interaction des deux facteurs n'a été observé. Les lettres entre parenthèses correspondent aux groupes issus du test de Neuman-Keuls.

Les abondances relatives des gènes *arsB* et *ACR3* dans l'inoculum de départ, représentés par les flèches rouges sur les figures 43 et 44, sont respectivement de $2,4.10^{-3}$ et $8,2.10^{-3}$ copies par copie du gène codant l'ARNr 16S.

Dans la mesure où il n'y avait pas de biomasse bactérienne dans les cultures en présence de 10 mM d'As(III) après deux jours d'incubation (figure 39), les gènes cibles n'ont pas été quantifiés pour cette condition et à ce temps (étoiles bleues). Ainsi, les analyses statistiques ont été réalisées uniquement sur les données obtenues pour les concentrations 0, 10 μ M, 100 μ M et 1 mM d'As(III) (§ Partie V du Matériels et Méthodes).

Le nombre de copies du gène *arsB* est significativement plus élevé dans les cultures en présence de 1 mM d'As(III) et aucun effet du temps n'a été détecté sur l'abondance relative de ce gène. L'abondance relative du gène *ACR3* tend à diminuer au cours du temps tout en restant à un niveau maximal en présence de 1 mM d'As(III). Pour ce même gène, on observe une forte erreur standard pour la condition 10 mM d'As(III). Cependant, cette erreur n'est pas observée pour le gène *arsB* (figure 45), ni pour *aioA* (§ suivant : III.3.2.2.) et pour le gène codant l'ARNr 16S (non présentés).

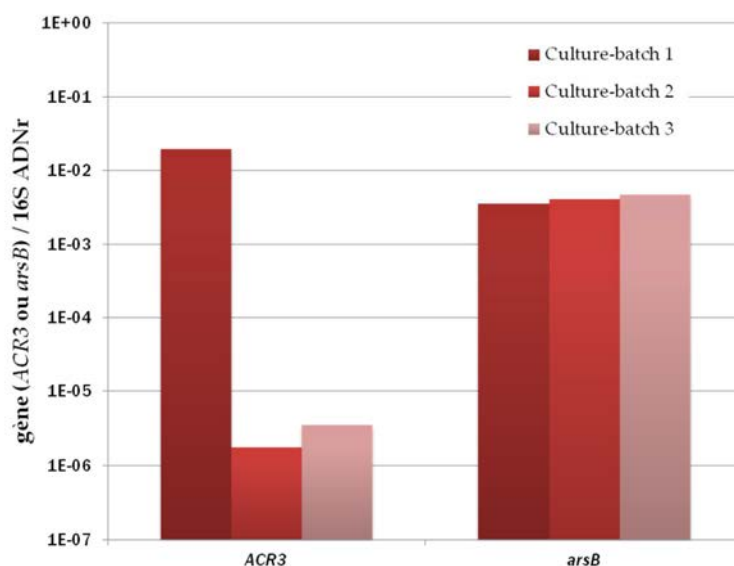
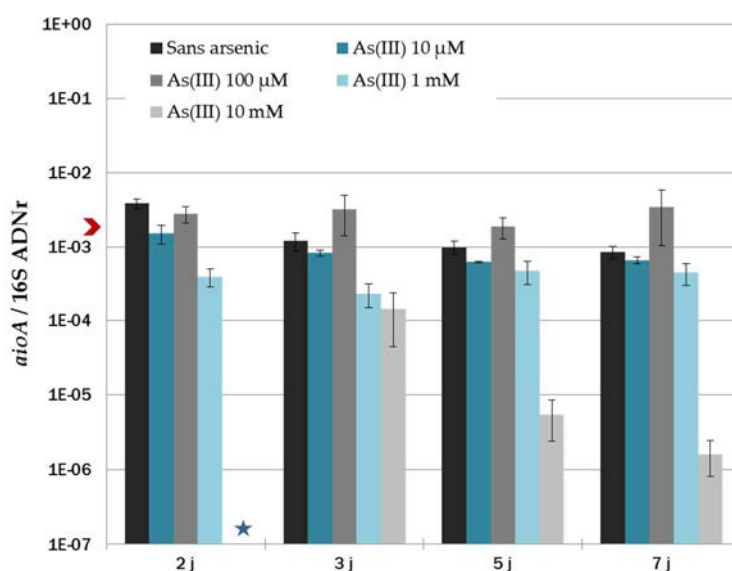


Figure 45 : Abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3* dans chaque réplicat en présence de 10 mM d'As(III), après 7 jours d'incubation

III.3.2.2. Abondance relative du gène *aioA*

Parallèlement aux gènes de résistance à l'arsenic, nous avons quantifié l'abondance relative du gène *aioA* codant l'As(III)-oxydase, représentée par le ratio ADN *aioA* / ADNr 16S. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 46. L'ANOVA à 2 facteurs indique que l'abondance relative du gène *aioA* est plus faible en présence de 1 mM d'As(III) et n'est pas influencée par le temps d'incubation. Les données à 10 mM d'As(III) ne sont pas incluses dans l'analyse statistique, mais nous pouvons constater qu'après deux jours d'expérience, l'abondance relative de ce gène est très inférieure à celle quantifiée dans les batchs en présence de 1 mM d'As(III).



Facteur	p- valeur	Effet			
Concentration	< 0,0001	Sans arsenic (ab)	10 µM (bc)	100 µM (a)	1 mM (c)
Temps	0,080				

Figure 46 : Abondance relative du gène *aioA* dans les cultures au cours du temps.

L'étoile signifie que ce gène n'a pas été détecté. Le tableau présente les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs. Aucun effet de l'interaction des 2 facteurs n'a été observé. Les lettres entre parenthèses correspondent aux groupes issus du test de Neuman-Keuls.

III.3.3. CORRELATIONS ENTRE L'ABONDANCE RELATIVE DES GENES ET LES CONCENTRATIONS EN ARSENIC TOTAL

L'analyse statistique des résultats d'abondance relative de ces gènes a été poursuivie *via* un test de corrélation de Pearson. L'objectif est de déterminer si les proportions de bactéries portant les gènes ciblés dans cette étude sont liées aux concentrations en arsenic total au sein

des cultures et pour chaque temps de prélèvement. Les coefficients de Pearson ainsi que les *p*-valeurs sont présentés dans le tableau 17.

Ce test révèle, d'une manière intéressante, que l'abondance relative du gène *ACR3* est corrélée positivement à la concentration en arsenic au cours du temps, que l'on considère le nombre de copies du gène *ACR3* par µg d'ADN (coefficient de Pearson allant de 0,727 à 0,875) ou par copie du gène codant l'ARNr 16S (coefficient de Pearson allant de 0,676 à 0,854). Il en est de même pour l'abondance relative du gène *arsB*, qui est corrélée à la concentration en arsenic excepté pour le ratio *arsB*/ADNr 16S au prélèvement à deux jours. Pour les ratios *arsB*/µg ADN, les coefficients de Pearson s'étendent de 0,712 à 0,927. Ainsi, les corrélations entre l'abondance relative de ces deux gènes et les teneurs en arsenic total sont de plus en plus fortes au cours du temps.

En revanche, nous notons une corrélation négative entre l'abondance relative du gène *aioA* et les concentrations en arsenic, mais elle n'est significative qu'au moment du prélèvement à deux jours d'expérience pour le ratio ADN *aioA* / ADNr 16S.

Abondance relative des gènes	Coefficient de corrélation de Pearson (<i>p</i> -valeur)			
	2 j	3 j	5 j	7 j
ADNr 16S/µg ADN	0,041	0,382	0,639	0,724 (0,012)
<i>arsB</i> /µg ADN	0,712 (0,009)	0,834*	0,899*	0,927*
<i>arsB</i> /ADNr 16S	0,499	0,841*	0,934*	0,944*
<i>ACR3</i> /µg ADN	0,727 (0,007)	0,850*	0,958*	0,875*
<i>ACR3</i> /ADNr 16S	0,676 (0,016)	0,881*	0,956*	0,854*
<i>aioA</i> /µg ADN	-0,457	0,465	0,458	0,569
<i>aioA</i> /ADNr 16S	-0,722(0,008)	-0,452	-0,337	-0,142

Tableau 17 : Test de corrélation de Pearson entre l'abondance relative des gènes bactériens et la concentration en arsenic pour les prélèvements réalisés au bout de 2 j, 3 j, 5 j et 7 j d'incubation.

Les abondances relatives du gène *ACR3* à 10 mM d'As(III) ne sont pas incluses dans cette analyse. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs dont la corrélation présente une *p*-valeur < 0,05. * signifie que la *p*-valeur est égale ou inférieure à 0,0001 et les autres *p*-valeurs sont précisées entre parenthèses.

III.3.4. DYNAMIQUE D'EXPRESSION DES GENES DE RESISTANCE

L'objectif est de déterminer si l'arsenic induit l'expression des gènes cibles dans la communauté et dans ce cas, de préciser la dynamique d'expression de ces gènes au cours du temps d'incubation des enrichissements.

III.3.4.1. Expression des gènes *arsB* et *ACR3*

La figure 47 représente l'évolution du ratio entre le nombre de copies d'ARNm cibles *arsB* et *ACR3* et le nombre de copies des gènes correspondant dans les différents batchs inoculés. La limite de détection est de l'ordre de 10^2 copies pour le gène *arsB* et de l'ordre de 10^1 copies pour le gène *ACR3* (§ Partie I du chap. Résultats). Nous pouvons néanmoins observer sur la figure 47 que la transcription des gènes *arsB* et *ACR3*, indétectable en absence d'arsenic, augmente fortement après trois jours d'incubation en présence d'une concentration de 100 μM d'As(III). Il semble que la concentration 10 μM soit trop faible pour induire une expression mesurable des gènes de résistance à l'arsenic. Après sept jours, la transcription des gènes *arsB* et *ACR3* n'est plus détectée chez les bactéries se développant en présence de 100 μM et 10 mM d'As(III). En revanche, elle a toujours lieu dans un des trois réplicats des cultures contenant 1 mM d'As(III). Bien que nous n'ayons pas pu réaliser d'analyses statistiques en raison des nombreuses valeurs manquantes, il est intéressant de constater que pour ces deux familles de gènes, la dynamique d'expression suit la même tendance.

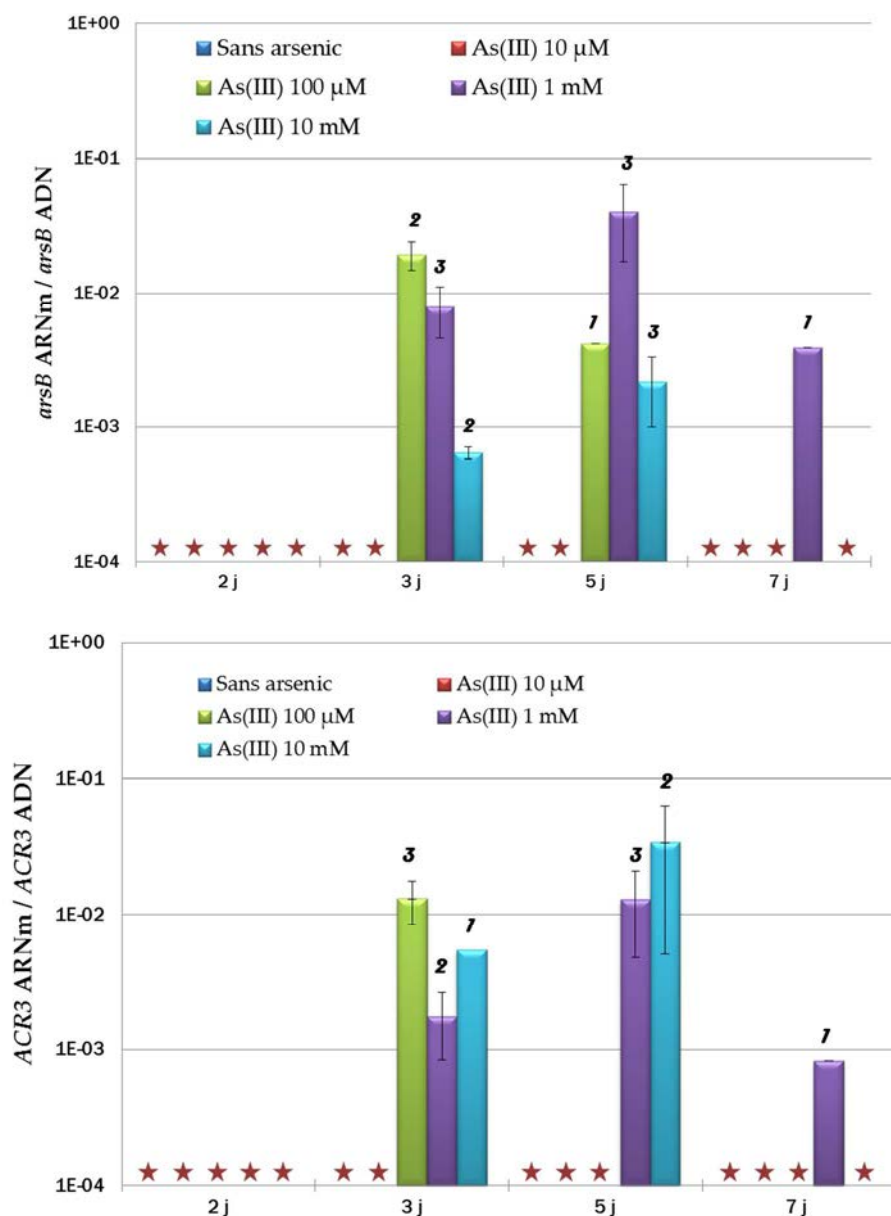


Figure 47 : Expression relative des gènes *arsB* (histogramme du haut) et *ACR3* (histogramme du bas) dans les batchs au cours du temps.

L'étoile rouge signifie que l'ADNc n'a pas été détecté. L'expression relative a été détectée dans un, deux ou trois réplicats comme le montre les chiffres au sommet des barres des histogrammes.

III.3.4.2. Expression du gène *aioA*

La figure 48 présente l'évolution de l'expression relative du gène *aioA*, exprimée également par le ratio entre le nombre de copies d'ARNm *aioA* et le nombre de copies des gènes correspondant. Pour l'ensemble des conditions, l'expression est indétectable à deux jours d'incubation. De plus, tout au long de l'expérience, aucune expression n'est détectée dans les enrichissements en présence de la plus forte concentration en As(III), c'est-à-dire 10 mM. En revanche, le gène *aioA* est exprimé en absence d'arsenic et en présence de 10 µM, 100 µM et 1

mM d'As(III) à partir de trois jours d'incubation. Dans ce cas aussi, les analyses statistiques n'ont pas pu être réalisées sur l'ensemble des conditions et pour chacun des temps. En revanche, l'ANOVA à deux facteurs sur les données provenant des cultures ne contenant pas d'As(III) et contenant 10 μ M, 100 μ M et 1 mM d'As(III) indique un effet de la concentration en As(III) ($p = 0,005$). Ainsi l'expression du gène *aioA* est significativement plus importante dans la communauté bactérienne se développant en présence de 10 μ M d'As(III) que dans les autres conditions.

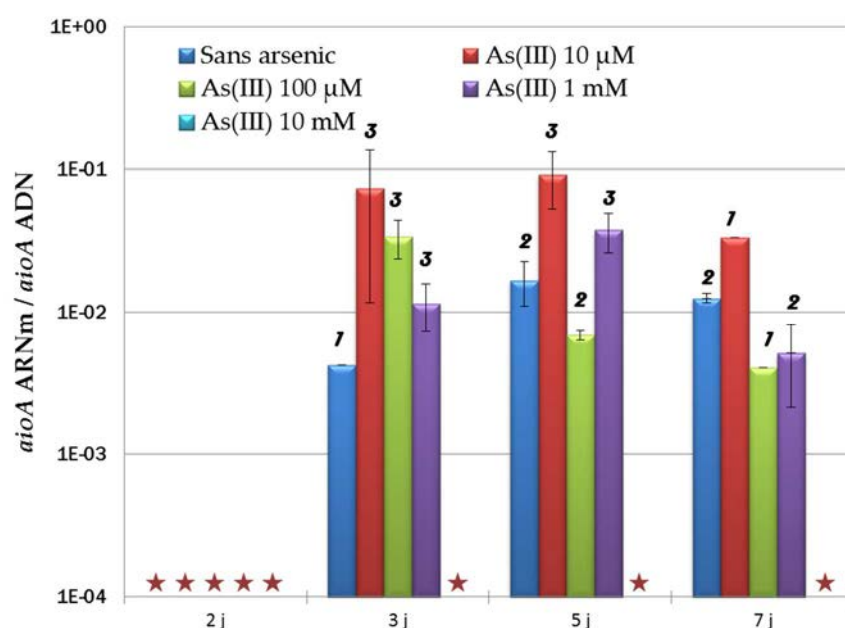


Figure 48 : Expression relative du gène *aioA* dans les batchs au cours du temps.

L'étoile rouge signifie que l'ADNc n'a pas été détecté. L'expression relative de ce gène a été détectée dans un, deux ou trois réplicats comme le montre les chiffres au sommet des barres des histogrammes.

III.3.5. ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE DANS LES CULTURES EN PRESENCE D'ARSENIC

III.3.5.1. Analyse par CE-SSCP

La figure 49A représente le profil CE-SSCP des gènes codant l'ARNr 16S bactériens détectés dans l'inoculum extrait du sol par gradient de densité. Le nombre de pics détectés (env. 15 pics) indique que la diversité bactérienne dans cet échantillon juste après l'extraction des cellules du sol est importante. En revanche, les profils obtenus pour toutes les autres conditions sont identiques avec un pic majoritaire (figure 49B). Il semblerait qu'après deux jours d'incubation et quelle que soit la concentration en As(III), la communauté bactérienne

est dominée par une population, les éventuelles autres populations n'étant pas visualisables par cette technique, car elles sont proportionnellement trop peu abondantes. Une analyse par PCR TTGE des gènes codant l'ARNr 16S et des ARNr 16S a été réalisée pour confirmer ces résultats.

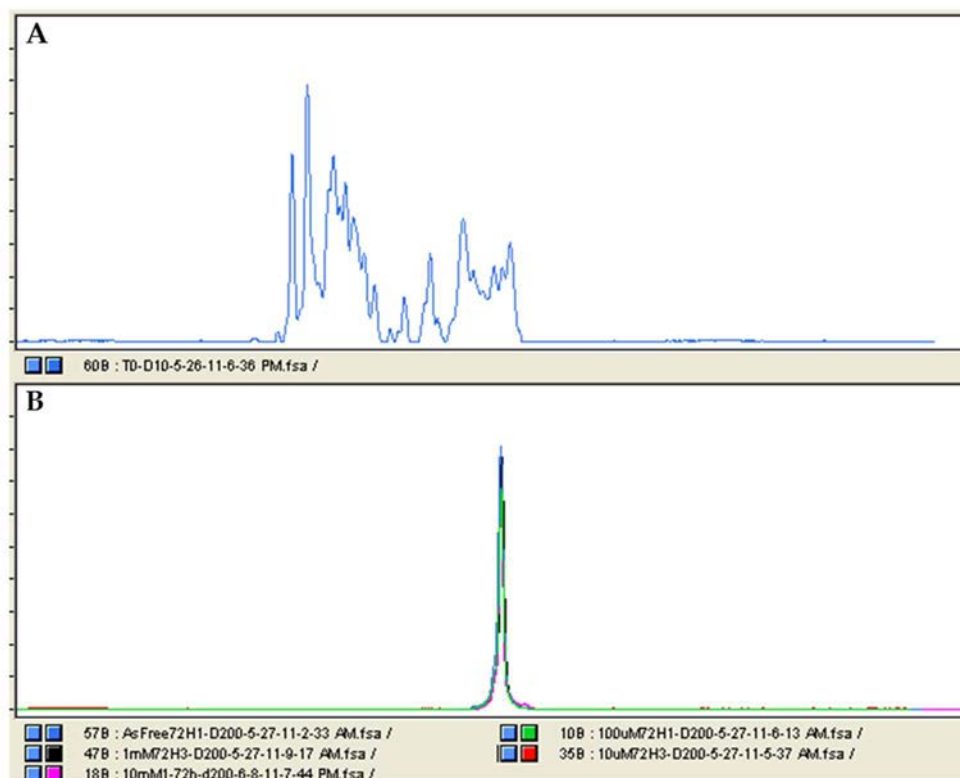


Figure 49 : Profils CE-SSCP des produits PCR du gène codant l'ARNr 16S (région V3) issus de l'ADN bactérien de l'inoculum initial (A) et des cultures après 2 j, 3 j, 5j et 7 j, en absence d'As(III) et en présence de 10 μM, 100 μM, 1 mM et 10 mM d'As(III) (B).

III.3.5.2. Analyse par PCR-TTGE

La structure de la communauté bactérienne a été analysée par PCR-TTGE des gènes codant l'ARNr 16S et des ARNr 16S après rétro-transcription (ADNc). La figure 50 représente les profils électrophorétiques obtenus à partir des cultures incubées en absence d'arsenic et en présence de 10 μM et 100 mM d'As(III). La comparaison des profils ADN et ADNc ne met pas en évidence de différence majeure, ce qui suggère que la majorité des bactéries présentes dans les cultures sont actives puisqu'elles expriment le gène codant l'ARNr 16S. De plus, comme révélé par les résultats de CE-SSCP, il n'y a pas d'évolution appréciable des profils au cours du temps. Ceci indique que la structure de la communauté n'est plus modifiée après deux jours d'incubation et quelle que soit la concentration en arsenic. La bande

majoritaire apparaissant en bas du gel présenté dans la figure 50 correspond probablement à l'unique pic visualisé sur les profils CE-SSCP.

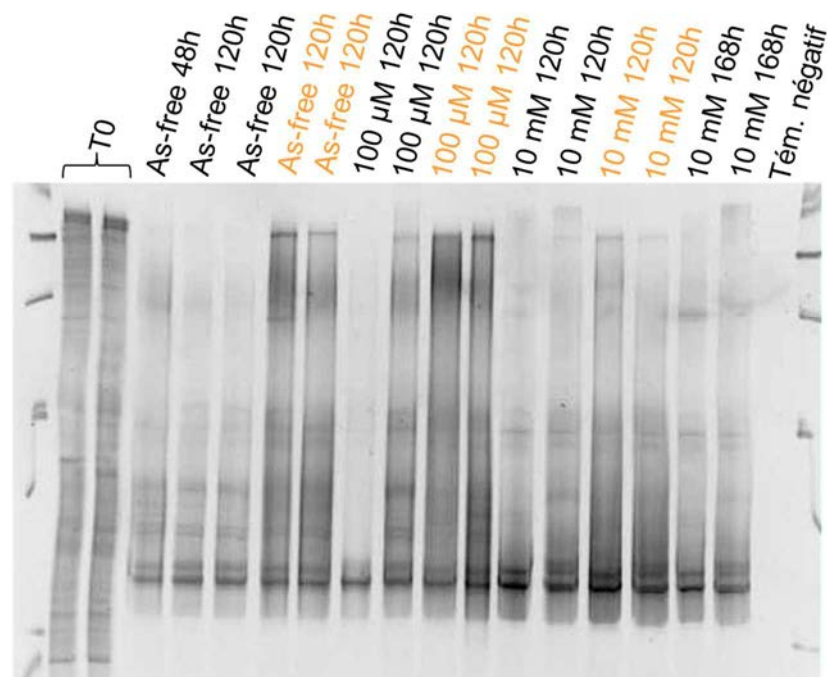


Figure 50 : Profils TTGE du gène codant l'ARNr 16S (ADN) et de l'ARNr 16S (ADNc) des cultures.
Les profils annotés en noir correspondent aux produits PCR issus de l'ADN et les profils en orange correspondent aux produits PCR issus de l'ADNc.

III.3.5.3. Clonage-séquençage

Afin de poursuivre notre étude sur la diversité bactérienne, nous avons cloné et séquencé les ADNc obtenus après rétro-transcription des ARNr 16S extraits après cinq jours d'incubation, dans l'enrichissement témoin sans As(III), en présence d'1 mM et de 10 mM d'As(III). L'objectif était d'identifier les espèces bactériennes métaboliquement actives dans ces enrichissements. Comme les analyses de la diversité par TTGE et CE-SSCP le suggèrent, la communauté bactérienne active est faiblement diversifiée. En effet, parmi les 46 séquences d'ARNr 16S analysées, 45 étaient apparentées au genre *Pseudomonas* et un clone seulement était affilié au genre *Enterobacter* (Tableau 18). Notons que ce clone isolé provient de la culture contrôle sans arsenic.

L'analyse de la diversité des transcrits codant les pompes d'efflux de l'As(III) révèle également des séquences affiliées au genre *Pseudomonas*. Dans les cultures en absence d'arsenic, l'expression des gènes *arsB* et *ACR3* n'a pu être détectée et c'est pour cette raison

que nous ne présentons aucune séquence pour cette condition. En revanche, sur sept clones *arsB* séquencés pour la condition 1 mM d'As(III), quatre sont apparentés au genre *Pseudomonas* et trois sont proches du clone « Uncultured bacterium clone ArsBCarn_43 » (le plus proche voisin cultivé appartenant également au genre *Pseudomonas*). Ces dernières séquences sont également retrouvées dans les cultures en présence de 10 mM d'As(III) avec deux séquences affiliées au clone *Pseudomonas fluorescens* A506. Les séquences *ACR3* ont témoigné d'une diversité encore plus faible puisque seules des séquences proches du gène *ACR3* de *Pseudomonas putida* ND6 ont été mises en évidence dans les cultures contenant 1 mM et 10 mM d'As(III).

Le cas du gène *aioA* est différent car des séquences présentant de fortes similarités avec les gènes *aioA* de *Pseudomonas* sp. 46 sont exprimées en absence d'arsenic. Ces séquences sont également retrouvées en présence de 1 mM d'As(III). Néanmoins, dans cette dernière condition, d'autres séquences *aioA* montrant des affiliations taxonomiques diverses sont exprimées. C'est le cas du clone NMaioA_4, proche du gène *aioA* d'*Acinetobacter* sp. 33, une souche isolée de la mine d'or de Salsigne (Aude) contaminé par l'arsenic (Quéméneur *et al.*, 2008). Nous ne sommes pas parvenus à amplifier l'ADNc *aioA* obtenus à partir des ARN provenant des enrichissements incubés en présence de 10 mM d'As(III).

ADNc	Clone ID (No. accession)	Nombre de clones			Voisin caractérisé le plus proche (No. accession)	Identité (%)
		Témoin sans As(III)	As(III) 1 mM	As(III) 10 mM		
16S	NM16S_1 (JX863389)	8	8	12	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> NFM421 (DQ178233)	99
	NM16S_2 (JX863390)	-	10	6	<i>Pseudomonas putida</i> HS-N24 (EF100617)	99
	NM16S_3 (JX863391)	1	-	-	<i>Enterobacter cancerogenus</i> PSB20 (HQ242733)	99
	NM16S_4 (JX863392)	1	-	-	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 19318_ZC5M6_G12 (JQ897449)	99
arsB	NMarsB_1 (JX863398)		3	4	Uncultured bacterium clone ArsBCarn_43(FR847155)	80
	NMarsB_2 (JX863399)		1	-	<i>Pseudomonas</i> sp. A23 (AM283014)	74
	NMarsB_3 (JX863400)		1	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 (AM181176)	86
	NMarsB_4 (JX863401)		2	2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506 (CP003041)	88
aioA	NMaioA_1 (JX863393)	10	3		<i>Pseudomonas</i> sp. 46 (EU304277)	99
	NMaioA_2 (JX863394)	-	3		Uncultured bacterium <i>aioA</i> , clone EM-2d2 (AB730899)	94
	NMaioA_3 (JX863395)	-	1		Uncultured bacterium clone T12RSOL19 (EU304310)	90
	NMaioA_4 (JX863396)	-	1		<i>Acinetobacter</i> sp. 33 (EU304275)	89
	NMaioA_5 (JX863397)	-	1		Enrichment culture clone aioheteroA80_4W (ADF47247)	99
ACR3	NMACR3_1 (JX863402)		3	9	<i>Pseudomonas putida</i> ND6 (CP003588)	90

Tableau 18 : Résultats « blastn » du séquençage de l'ADNc 16S, arsB, ACR3 et aioA, pour les conditions sans As(III), 1 mM et 10 mM d'As(III) après 5 j d'incubation

III.4. DISCUSSION

III.4.1. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES CULTURES

La croissance des cultures bactériennes est affectée par l'arsenic présent dans le milieu, un effet visible de la toxicité étant observé pour les concentrations de 1 mM et de 10 mM d'As(III). Dans ces dernières conditions, les bactéries ont consommé le glucose plus lentement que dans les autres conditions.

Nous avons constaté une acidification du milieu de culture dès deux jours d'incubation (§ III.3.1.2. de cette partie). Au début de l'expérience, le pH du milieu a été ajusté à pH 7,7 afin de se rapprocher du pH du sol de Neuves-Maisons, à partir duquel les bactéries ont été extraites. Dans le cas des cultures en batch sans As(III), le pH chute rapidement de plus de 3 unités alors qu'il reste stable dans les témoins abiotiques, indiquant que cette forte acidification est bien due à l'activité bactérienne. Une acidification similaire est observée dans les cultures en présence de 10 μ M et 100 μ M d'As(III). En revanche, le pH diminue moins rapidement et moins fortement dans les enrichissements contenant 1 mM et 10 mM d'As(III), certainement en raison du retard de croissance associé à la toxicité de l'arsenic. En condition aérobie, les bactéries dégradent le glucose *via* le cycle de Krebs et libèrent ainsi de nombreux acides organiques, comme par exemple les acides pyruvique et acétique, ce qui peut contribuer à une légère acidification du milieu de culture (Eagon et Cho, 1965). Par ailleurs, il est reconnu que de nombreuses bactéries, souvent apparentées au genre *Pseudomonas*, utilisent une voie alternative d'oxydation du glucose *via* une glucose-déshydrogénase conduisant à la sécrétion et à l'accumulation de l'acide gluconique dans leur milieu et à une chute importante du pH (Lessie et Phibbs, 1984). De plus, le gluconate est métabolisé par les bactéries à partir du moment où tout le glucose a été transformé ; c'est ce que nous remarquons, au bout de deux jours d'incubation, dans les cultures sans arsenic et contenant 1 mM d'arsenic et, au bout de trois jours d'incubation, dans les autres cultures.

Pour chacune des conditions expérimentales, l'As(III) est oxydé en As(V) par la communauté bactérienne présente dans les enrichissements. Cependant, nous observons de fortes variations d'activité As(III)-oxydase entre les trois réplicats de culture en présence de 10 mM d'As(III). De telles différences d'activité pourraient s'expliquer par la forte pression de sélection exercée par l'arsenic sur la communauté bactérienne : la forte concentration en As(III) aurait pu conduire à un enrichissement de populations différentes et ce malgré un

inoculum « homogène ».Cependant, un seul pic majoritaire en CE-SSCP est observé ainsi que des profils de bandes TTGE identiques ce qui est incohérent avec cette hypothèse. La pression de sélection agirait alors en termes d'activité plutôt qu'en termes de diversité de populations bactériennes. Ces activités variables seraient la cause des variations de consommation du glucose et d'évolution du pH mesurées.

III.4.2. CHOIX DE L'ANALYSE STATISTIQUE

Pour analyser les résultats de quantification de l'abondance et de l'expression des gènes cibles, la question du choix de l'analyse statistique à effectuer s'est posée. Cette expérience présente deux facteurs variables que sont le temps et la concentration en As(III), la réalisation d'une ANOVA à deux facteurs semblait donc appropriée. Cependant, les prélèvements au cours de l'incubation ont été réalisés dans les mêmes erlenmeyers, réduisant à chaque fois le volume du milieu de culture. Dans ce cas, les échantillons peuvent être considérés comme non indépendants, ce qui interdit théoriquement l'application de l'ANOVA à deux facteurs. L'ANOVA à mesures répétées est convenable lorsque des mesures sont effectuées dans le temps sur une même unité et que ces unités peuvent avoir des comportements qui leur sont propres. Cette ANOVA à mesures répétées a été réalisée et les résultats ont montré que le facteur répétition n'avait aucun effet. Nous nous sommes donc dirigés vers une ANOVA à deux facteurs en considérant que les prélèvements successifs dans une même culture ne jouaient aucun rôle sur la réponse des bactéries à l'arsenic.

III.4.3. CORRELATION ENTRE ABONDANCE RELATIVE DES GÈNES CIBLES ET CONCENTRATION EN ARSENIC TOTAL

L'analyse statistique des données de PCR en temps réel montre que, globalement, l'abondance relative du gène *arsB* ne varie pas en fonction du temps, alors qu'elle tend à diminuer pour les gènes *ACR3* après deux jours d'incubation. De façon intéressante, l'abondance des gènes *arsB* et *ACR3* est significativement plus importante lorsque les bactéries sont incubées en présence d'1 mM d'As(III). Ceci suggère que la croissance des bactéries possédant ces gènes est favorisée à cette concentration en As(III), simplement parce que les pompes d'efflux constituent un système de détoxification robuste. Pour des

concentrations plus faibles, la présence de ces gènes ne serait pas requise du fait d'une pression toxique moins forte.

Cette hypothèse est confortée par les fortes corrélations entre l'abondance des gènes *arsB* et *ACR3* dans la communauté et le niveau d'exposition à l'arsenic total, ce qui est cohérent avec le rôle que jouent ces deux gènes dans les processus de détoxification bactérienne. La corrélation avec le gène *ACR3* n'est cependant plus valable pour la condition 10 mM d'As(III), probablement en raison de la forte toxicité pour les cellules bactériennes.

La tendance observée pour les gènes de résistance ne s'applique pas au gène *aioA*. En effet, l'abondance relative des gènes *aioA* dans la communauté ne varie pas en fonction du temps mais en présence de 100 µM d'As(III) et elle diminue significativement pour la condition 1 mM. Cette diminution est encore plus prononcée pour les incubations en présence de 10 mM d'As(III). Nous pouvons supposer que les bactéries possédant ce gène et présentes dans l'inoculum initial ne sont pas parvenues à résister à de trop fortes concentrations d'arsenic. Nous n'avons pas repéré dans la littérature d'exemple de bactérie arsenite-oxydante capable de tolérer des concentrations en As(III) très élevées (Chang *et al.*, 2007).

De précédentes études conduites par PCR en temps réel ont déjà été menées (Sun *et al.*, 2004 ; Bouskill *et al.*, 2007) avec de fortes corrélations rapportées entre l'abondance du gène *sodA* (superoxyde dismutase A) codant des protéines anti-oxydantes et les contaminations en arsenic, zinc et cuivre dans des sédiments chez la bactérie *P. aeruginosa* (Bouskill *et al.*, 2007). Dans cette étude, l'abondance du gène *mt* (métallothionéine), impliqué dans des processus de résistance aux métaux était, elle aussi, fortement corrélée à la contamination de ces sédiments.

III.4.4. CINETIQUE D'EXPRESSION ET DIVERSITE DES GENES

arsB ET *ACR3*

La quantification des gènes est une analyse intéressante mais elle nous permet uniquement d'évaluer la proportion de microorganismes possédant les gènes cible. En revanche, l'expression des gènes cibles témoigne d'une partie de la réponse des bactéries aux variations de conditions de leur habitat. Suite à cette étude, il apparaît clairement que la transcription des gènes *arsB* et *ACR3* est induite par la présence d'As(III) et cela à partir de 100 µM d'As(III) et après trois jours d'incubation. Cependant, les analyses transcriptionnelles des

gènes *ars* dans différentes souches bactériennes indiquent que la levée de la répression à lieu généralement à des concentrations en arsenic inférieures à celles observées dans cette étude (de l'ordre de 1 à 10 μ M) et après seulement quelques dizaines de minutes d'exposition. (Diorio *et al.*, 1995 ; Tauriainen *et al.*, 1997 ; Lopez-Maury *et al.*, 2003 ; Ordonez *et al.*, 2005). Ces divergences pourraient être expliquées par une dégradation accrue des ARN lors de l'extraction et/ou une faible efficacité de l'étape de reverse transcription, qui entrainerait un rendement d'ADNc plus faible et, au final, à une diminution de la sensibilité de la méthode de RT-PCR en temps réel.

Nous pouvons remarquer que les séquences *arsB* affiliées au genre *Pseudomonas* sont plus diverses que les séquences *ACR3* puisque quatre séquences *arsB* ont été répertoriées contre seulement une séquence *ACR3*. Ce résultat peut paraître surprenant, étant donné la large occurrence de ces deux familles de transporteurs chez les bactéries. Cependant, il est important de rappeler que les amorces utilisées ciblent les gènes *ACR3(1)* et donc ne permettent pas de récupérer l'ensemble des gènes de la famille *ACR3* chez l'ensemble des bactéries.

III.4.5. CINETIQUE D'EXPRESSION DU GENE *AIOA* ET OXYDATION DE L'As(III) EN As(V)

Nous n'avons pas observé d'induction de la transcription du gène *aioA* dans cette expérience, l'expression relative des gènes *aioA* ne variant sensiblement pas selon le niveau d'exposition à l'arsenic et le temps d'incubation. L'expression de ce gène, mise en évidence dans cette expérience, semble constitutive à un niveau basal puisque ce gène est exprimé même en absence d'arsenic. L'apparition d'As(V) dans les cultures contenant initialement 10 mM d'As(III) n'a pas pu être confirmée par une expression détectable des ADNc *aioA* et, d'une manière surprenante, c'est dans cette condition que l'abondance relative de ce gène est la plus faible. En 2007, Inskeep *et al.* ont amplifié pour la première fois des gènes *aioA* à partir d'échantillons de sols et de sédiments dans lesquels l'As(III) est oxydé en As(V). Dans certains cas cependant, aucune amplification n'a été obtenue malgré une production biologique d'As(V). Il semblerait donc que les processus d'oxydation de l'As(III) ne soient pas toujours concomitants de l'occurrence mais aussi de l'expression des gènes *aioA* dans les dispositifs expérimentaux et/ou dans les conditions environnementales comme l'a montré

Wang *et al.* en 2012. Les auteurs ont démontré des processus de réduction et d'oxydation dans le milieu de croissance de *Pteris vittata* L., une plante hyperaccumulatrice d'arsenic (Gonzaga *et al.*, 2008). Pour identifier les bactéries arsénite-oxydantes, des amorces dégénérées ont été utilisées afin d'amplifier un fragment d'environ 500 pb du gène *aioA* à partir de l'ADN extrait du milieu de croissance de la plante. D'une manière surprenante, une seule séquence a été amplifiée et parmi les quatre souches bactériennes isolées et oxydant l'As(III), ils ne sont pas parvenus à amplifier ce gène avec ces amorces chez la souche étant la plus efficace en terme d'oxydation. Les auteurs justifient ce résultat par le fait que ces amorces, différentes de celles utilisées dans cette étude, ne sont pas assez appropriées pour cibler cette espèce *Comamonas* sp. Ils s'appuient sur l'étude de Hoeft *et al.* (2010), n'ayant également pas obtenu d'amplicon *aioA* à partir d'ADN extrait d'un biofilm bactérien présentant une grande activité d'oxydation de l'As(III). De surcroît, Wang *et al.* (2012) proposent des explications alternatives qui consistent à dire que cette espèce bactérienne possède une séquence très divergente des autres séquences connues dans les bases de données ou que l'oxydation de l'As(III) passe par d'autres mécanismes non connus à l'heure actuelle.

De plus, le fait que 4 séquences *aioA* différentes sont exprimés en présence d'1 mM d'As(III) mais pas dans les enrichissements sans arsenic implique que ces gènes-ci sont probablement régulés par l'arsenic. Cette induction de l'expression est une caractéristique de la plupart des bactéries As(III)-oxydantes (Slyemi et Bonnefoy, 2012). L'activité As(III) – oxydase en absence d'As(III) a déjà été rapportée dans quelques souches bactériennes telles que *Thiomonas* sp. 3As (Duquesne *et al.*, 2008), *Ralstonia* sp. 22 (Lieutaud *et al.*, 2010), la bactérie psychrotolérante GM1 (Osborne *et al.*, 2010) et *Agrobacterium tumefaciens* 5A (Kashyap *et al.*, 2006). Dans ce dernier cas, l'oxydation de l'As(III) serait régulée par « quorum-sensing » en phase stationnaire.

Nos résultats montrent que cette expression basale des gènes *aioA* peut concerner certaines souches de *Pseudomonas*, alors que dans une étude de Cai *et al.* en 2009 (b), la souche *Pseudomonas* sp. TS44 ne témoigne d'aucune expression d'*aioA* en absence d'arsenic.

Nous pouvons également avancer l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes *aioA*. Il existe, en effet, certaines bactéries As(III)-oxydantes qui ne

possèdent pas les gènes de régulation *aioRS* ce qui souligne de nombreuses différences dans les processus de régulation des gènes *aio* (Muller *et al.*, 2007 ; Koechler *et al.*, 2010) et pourrait expliquer les divergences observées entre les différentes études citées précédemment. Nous pouvons imaginer que, dans certains cas, la régulation des gènes *aioA* se déroule après l'étape de transcription ce qui pourrait expliquer le fait que ces gènes soient exprimés en absence d'arsenic chez certaines bactéries. En revanche, il serait intéressant de vérifier si les ARNm présents de manière basale sont bien traduits en protéines fonctionnelles AioA dans ce cas précis.

III.4.6. DIVERSITE BACTERIENNE

Les analyses phylogénétiques soulignent la présence d'une bactérie proche de la souche *Pseudomonas brassicacaerum* NMF421 détectable dans chaque condition. Il s'agit d'une bactérie à Gram-négatif du sol, isolée de la rhizosphère de *Brassica napus* (le colza) et *Arabidopsis thaliana* (Achouak *et al.*, 2000) mais aucune information n'est connue, à notre connaissance, sur son niveau de résistance à l'arsenic. La présence de cette souche est cohérente avec le fait que les bactéries ont été extraites des parcelles végétalisées contenant le sol de Neuves-Maisons, il est donc possible que cette bactérie se développe dans la rhizosphère de *Medicago sativa*. Par ailleurs, cette étude amène un argument quant à la forte résistance de cette souche à l'arsenic puisque 12 clones sur les 18 séquencés expriment le gène codant l'ARNr 16S de cette bactérie, en présence de 10 mM d'As(III).

Des travaux menés précédemment au LIMOS indiquent que les communautés bactériennes du sol de Neuves-Maisons sont largement diversifiées, avec des représentants des principaux phyla bactériens (Cebron *et al.*, 2009). Ceci a été confirmé par le profil CE-SSCP de l'inoculum initial. En revanche, cette diversité bactérienne s'est affaiblie dès deux jours d'incubation et quelle que soit la concentration en As(III). Parmi les nombreux facteurs influençant la composition des communautés microbiennes, la teneur en carbone organique disponible est très importante puisqu'elle sélectionne des populations dont la croissance et la capacité d'utiliser les nutriments sont les plus compétitives (Drenovsky *et al.*, 2004) comme, dans notre cas, les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ces dernières sont connues comme étant des copiotrophes (stratégies r) (Overbeek et Elsas, 1997), dont la croissance est favorisée dans

des conditions d'abondance en nutriments, comme l'a montré une étude sur des sols amendés avec du glucose (Jenkins *et al.*, 2010).

Dans la présente expérience, nous n'avons pas mis en place de culture contrôle sans glucose, mais à l'évidence, cette source de carbone a fortement altéré la diversité bactérienne et a conduit à une prédominance de bactéries apparentées à *Pseudomonas*. Par conséquent, il nous est difficile de conclure sur une éventuelle corrélation entre l'affiliation phylogénétique et le niveau de contamination en arsenic.

➤ Les conclusions préliminaires découlant de ces expériences devront bien sûr être confirmées dans une matrice plus complexe, ce qui sera l'objet des chapitres suivants. En effet, les conditions expérimentales imposées à l'inoculum initial ont modifié quantitativement et qualitativement la structure et les fonctions de la communauté bactérienne (Madsen, 1995). Ce sera également le cas dans les expériences suivantes mais nous tenterons de nous rapprocher progressivement des conditions environnementales à travers une analyse *in situ* de l'abondance de ces trois gènes et une expérience en microcosmes de sol.

PARTIE IV : ETUDE EN MICROCOSMES DE SABLE DE L'IMPACT DE L'ARSENITE ET DE L'ARSENIATE SUR LA REPONSE TRANSCRIPTIONNELLE D'UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE

IV.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les microorganismes du sol de Neuves-Maisons étant probablement peu actifs vis-à-vis de l'arsenic au moment de leur prélèvement, l'utilisation de microcosmes semble être plus appropriée pour poursuivre l'évaluation de la méthode d'analyse par RT-PCR en temps réel des gènes de détoxification et d'oxydation de l'As(III). Tout comme dans la partie III du chapitre « Résultats », ces expériences visaient à caractériser l'impact de l'arsenic sur la structure d'une communauté bactérienne extraite du sol de Neuves-Maisons et sur l'expression des gènes fonctionnels *arsB*, *ACR3* et *aioA*, en se plaçant dans des conditions où la microflore affectée par l'arsenic ou utilisant ce métalloïde sera favorisée. Dans ce cas cependant, nous avons mis en place des microcosmes avec du sable stérile afin de complexifier le système d'étude et de tester la fiabilité de la méthode d'extraction des ARNm préalablement appliquée à des cultures de bactéries en milieu liquide. Les concentrations en arsenic pour cette étude ont été choisies sur la base (i) des résultats de l'expérience précédente en milieu liquide, indiquant que la croissance de la communauté était affectée pour des concentrations en As(III) supérieures à 0,1 mM et (ii) d'études montrant que les concentrations minimales inhibitrices (CMI) en arsenic pour de nombreuses bactéries du sol sont généralement comprises entre 1 mM et 20 mM d'As(III) et entre 25 mM et 500 mM d'As(V) (e.g. Ordonez *et al.*, 2005 ; Achour *et al.*, 2007 ; Sunita *et al.*, 2012). Nous avons opté pour des concentrations légèrement inférieures à ces CMI afin de provoquer un stress et modifier la communauté en sélectionnant des populations résistantes à l'arsenic, sans être bactéricide pour de nombreuses populations bactériennes.

Par ailleurs, l'étude précédente a permis de montrer que la stimulation de l'activité microbienne par le glucose induisait un biais important en favorisant la croissance de bactéries copiotrophes telles que *Pseudomonas*. Dans cette expérience en microcosme de sable, la communauté microbienne a été incubée en présence d'exsudats racinaires artificiels (ERA),

non seulement pour diversifier les sources de carbone et limiter les effets de sélection de bactéries à croissance rapide, mais également pour mimer de façon simplifiée les conditions rencontrées dans le compartiment rhizosphérique. En effet, différents travaux suggèrent que les exsudats racinaires peuvent contribuer à la mobilisation de l'arsenic dans la rhizosphère *via* des processus de complexation et/ou d'acidification et à augmenter son transfert vers les plantes (Fitz et Wenzel, 2002). Cependant l'impact des rhizodépôts sur les communautés microbiennes exposées à l'arsenic et les rétroactions possibles sur le devenir de ce métalloïde dans le sol sont encore mal compris.

IV.2. DEMARCHE EXPERIMENTALE

Cette expérience a été réalisée dans le cadre d'une étude plus large mise en place et suivie par Aurélie Cébron, visant à caractériser, en microcosmes de sol, l'impact du phénanthrène sur la diversité microbienne fonctionnelle en présence d'exsudats racinaires.

Une solution d'ERA mélangés dans un milieu Bushnell Haas a été ajoutée à 120 g de sable stérile dans les flacons appelés « Exsudats ». Parallèlement, cette même solution additionnée des deux formes inorganiques d'arsenic (0,66 mM d'As(III) et 12,5 mM d'As(V) soit environ 988 ppm d'arsenic) a été ajoutée aux 120 g de sable stérile dans les flacons appelés « Exsudats + arsenic ». Le sable est porté à 80 % de sa capacité de rétention en eau par ajout de 18,72 ml de ces solutions. Une communauté bactérienne, extraite du sol de la friche industrielle de Neuves-Maisons par centrifugation en gradient de densité (§ II.1.1. du Matériel et Méthodes), a ensuite été inoculée dans ces flacons à raison de $1,67 \cdot 10^5$ bactéries.g⁻¹ de sable. Cette expérience a été réalisée avec trois réplicats ainsi que pour les témoins sans source de carbone. La démarche expérimentale est schématisée dans la figure 51 et les prélèvements ont été effectués après six jours d'incubation. Nous avons suivi la cinétique de minéralisation du carbone pour les différents batchs, l'évolution du nombre de copies des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* ainsi que leur expression au sein de la communauté par PCR en temps réel. Les dosages des fractions d'arsenic total et d'As(V), présentes à la fin des six jours d'incubation, ont été réalisés de la manière suivante : les échantillons de sable (2 g) ont été mélangés pendant 1 h avec 13,2 ml d'eau déminéralisée. Après centrifugation à 10 000 g, les suspensions ont été filtrées à 0,22 µm puis la fraction d'arsenic total a été analysée par ICP-OES et la fraction d'As(V) par chromatographie ionique.

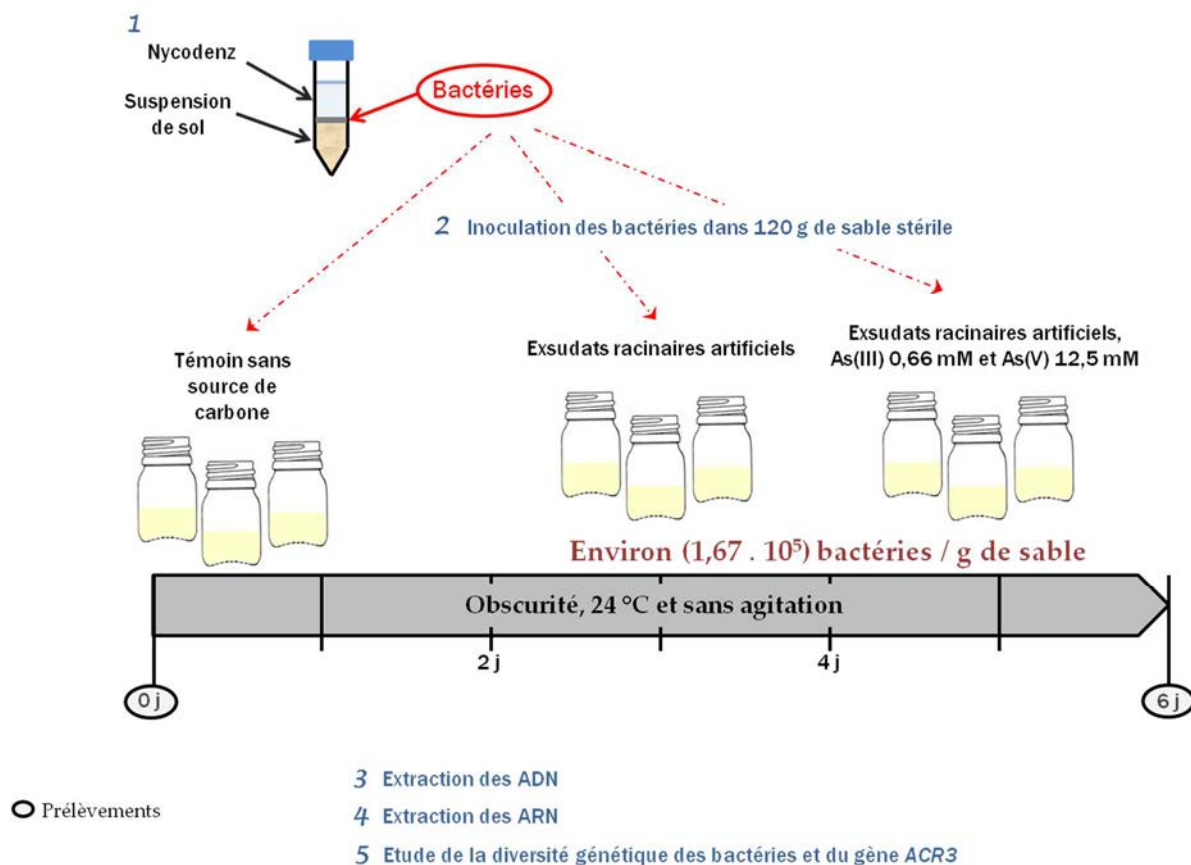


Figure 51 : Démarche expérimentale mise en place pour étudier la réponse d'une communauté bactérienne à un mélange d'As(III) et d'As(V)

IV.3. RESULTATS

IV.3.1. SUIVI DES PARAMETRES DES MICROCOSMES

IV.3.1.1. Activité microbienne

L'activité microbienne a été suivie durant l'incubation des microcosmes par mesure de la minéralisation du carbone (Figure 52). La production de CO₂ est nulle pour les batchs sans source de carbone et augmente dans les deux autres conditions (ERA et ERA + arsenic) après un jour d'incubation. L'activité microbienne est significativement plus importante en présence d'ERA seuls qu'en présence d'ERA et d'arsenic ($p < 0,05$). En revanche, pour cette dernière condition, les productions de CO₂ dans les trois réplicats ne suivent pas tout à fait la même cinétique. Après six jours d'incubation, nous notons un ralentissement de l'activité des communautés bactériennes incubées en présence ou en absence d'arsenic, après une

production d'environ 700 mg C-CO₂ / g de sable, sauf pour le réplicat R1 de la condition « ERA + arsenic » qui atteint seulement 460 mg C-CO₂ / g de sable.

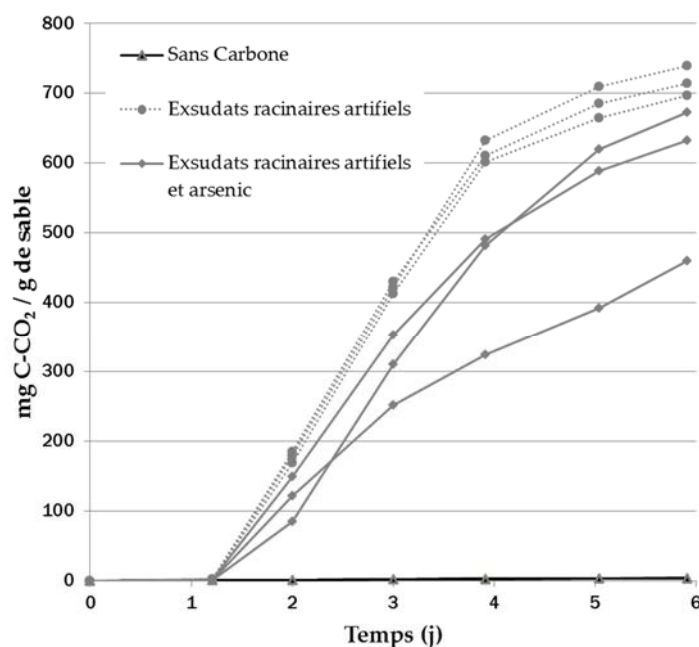


Figure 52 : Evolution de la minéralisation du carbone, correspondant à la production de CO₂, au cours des incubations des microcosmes

IV.3.1.2. Biotransformation de l'arsenic dans les

microcosmes

La concentration en As(V) prévue initialement dans la solution nutritive des microcosmes était égale à 12,5 mM d'As(V), mais le dosage par ICP de l'arsenic total et par chromatographie ionique de l'As(V) dans les fractions extractibles à l'eau sont inférieures à ces concentrations (Tableau 19). Dans la mesure où ces dosages n'ont pas été réalisés sur les échantillons de sable eux-mêmes mais sur la fraction extractible à l'eau obtenue après lixiviation du sable, nous pouvons supposer qu'une partie de l'arsenic est restée adsorbée aux grains de sable et / ou à la biomasse microbienne. L'éventuelle adsorption de l'arsenic fausse donc les valeurs d'arsenic total et d'As(V) mais aussi les valeurs d'As(III), obtenues par déduction des données précédentes. Nous nous référons donc aux données d'ICP et de chromatographie ionique et non aux valeurs théoriques pour évaluer les éventuels processus de biotransformation de l'arsenic. Pour les réplicats R1 et R2, la concentration en As(V) passe

de 6,78 mM au temps initial à 9,76 et 7,65 mM respectivement après 6 jours, suggérant une oxydation de As(III). Cependant, la fraction d'As(V) (ratio As(V) / As total) dans les extraits aqueux pour ces deux réplicats évolue très peu durant l'incubation, passant de 73% à T0 contre 76% pour R1 et 68% pour R2 à 6 jours, ce qui semble indiquer que l'arsenic n'a pas subi de transformation notable durant l'incubation.

Pour le réplicat R3, l'As(V) a certainement été réduit en As(III) car la concentration en As(V) a diminué et atteint 2,02 mM et le ratio As(V)/ As total n'est plus que de 26% après 6 jours d'incubation.

	Arsenic total (mM)	As(V) (mM)	As(III) déduit (mM)	Ratio As(V) / As total (%)
Temps initial	9,3 ± 0,8	6,78 ± 0,24	2,52	73
6 jours R1	12,9	9,76	3,1	76
6 jours R2	11,2	7,65	3,5	68
6 jours R3	7,7	2,02	5,7	26

Tableau 19 : Evolution de la concentration en arsenic total (dosée par ICP) et en As(V) (dosée par chromatographie ionique) dans les batchs.

IV.3.2. ABONDANCE ET EXPRESSION DES GENES CODANT LES TRANSPORTEURS D'As(III) ET LES As(III)-OXYDASES DANS LES BATCHS

Les gènes codant les transporteurs d'As(III), les As(III)-oxydases et l'ARNr 16S ont été quantifiés par PCR en temps réel dans les échantillons de sable prélevés après six jours d'incubation. Les résultats sont présentés dans le tableau 20. L'abondance des gènes codant l'ARNr 16S ne varie pas et est égale à $2,1 \cdot 10^9$ copies/g de sable, que ce soit en présence d'ERA ou d'ERA et d'arsenic. Le nombre de bactéries ne semble donc pas augmenter au bout de six jours d'incubation. En revanche, selon le test de Student, les abondances des trois autres gènes augmentent significativement, celle du gène *ACR3* ($p < 0,0001$) étant la plus prononcée puisqu'elle s'accroît d'un facteur 25 contre un facteur 9,5 pour l'abondance du gène *aioA* ($p < 0,0001$) et 2,9 pour l'abondance du gène *arsB* ($p = 0,046$).

Le tableau 20 présente aussi les résultats obtenus en ce qui concerne l'expression de ces gènes. L'abondance de l'ARNr 16S varie peu mais significativement entre les deux conditions testées ($p = 0,016$), les bactéries étant plus actives dans les microcosmes contenant uniquement des ERA, dès lors que la quantité d'ARNr 16S puisse être liée à l'activité des cellules bactériennes. Nous n'avons pas pu détecter les ADNc de *arsB*, *ACR3* ni de *aioA* dans

le cas des microcosmes en présence d'ERA seuls. En revanche, ces ADNc ont été détectés dans les microcosmes en présence d'ERA et d'arsenic, ce qui indique que l'expression de ces gènes a été induite par l'arsenic dans cette expérience. Notons tout de même qu'aucune expression du gène *aioA* n'a été quantifiée dans le réplikat R3 des batchs contenant des ERA et de l'arsenic. Ainsi, la moyenne de l'expression de ce gène a été calculée sur les données obtenus dans les réplicats R1 et R2 de cette même condition.

	ADN (copies de gènes / g de sable)			ARN (copies d'ARN / g de sable)		Ratio ARN / ADN Exsudats et arsenic
	Exsudats	Exsudats et arsenic	Facteur d'augmentation	Exsudats	Exsudats et arsenic	
16S	2,1.10 ⁹	2,1.10 ⁹	1	1,71.10 ⁹	1,02.10 ⁹	4,8.10⁻¹
<i>arsB</i>	5,5.10 ⁶	1,6.10 ⁷	2,9	nd	4,64.10 ²	2,9.10⁻⁵
<i>ACR3</i>	4,4.10 ⁵	1,1.10 ⁷	25	nd	8,36.10 ²	7,6.10⁻⁵
<i>aioA</i>	9,3.10 ⁴	8,8.10 ⁵	9,5	nd	1,34.10 ³ (sur R1 et R2)	1,5.10⁻³

Tableau 20 : Quantification par PCR en temps réel des gènes ADNr 16S, *arsB*, *ACR3* et *aioA* et de leurs transcrits respectifs dans les batchs contenant des exsudats seuls et des exsudats + arsenic après six jours. Les colonnes en rouge correspondent aux facteurs d'augmentation de l'abondance des gènes et aux ratios entre le nombre de copies des ARN et le nombre de copies du gène correspondant.

IV.3.3. ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE DANS LES BATCHS

La diversité taxonomique a été étudiée par TTGE (figure 53 – travaux d'Aurélié Cébron) et par isollements de souches bactériennes, afin de la comparer dans les microcosmes en présence d'ERA seuls et dans les microcosmes en présence d'ERA et d'arsenic, après six jours d'incubation. Les résultats du séquençage des bandes numérotées sur le gel TTGE ont été répertoriés dans le tableau 21. Les protéobactéries (essentiellement γ -protéobactéries) sont majoritaires dans les microcosmes puisque 71% des ribotypes identifiés par TTGE et 80% des clones isolés appartiennent à ce phylum dans la condition ERA et 25% et 91% respectivement dans la condition avec arsenic. Quelques représentants des bactéries à Gram positif (firmicutes et actinobactéries) ont également été retrouvés. C'est le cas du ribotype *Clostridium* identifié dans les microcosmes en absence d'arsenic ou de *Paenibacillus* et

Arthrobacter présents dans les deux conditions d'incubation. De plus, une souche du genre *Staphylococcus* a été isolée dans la condition ERA.

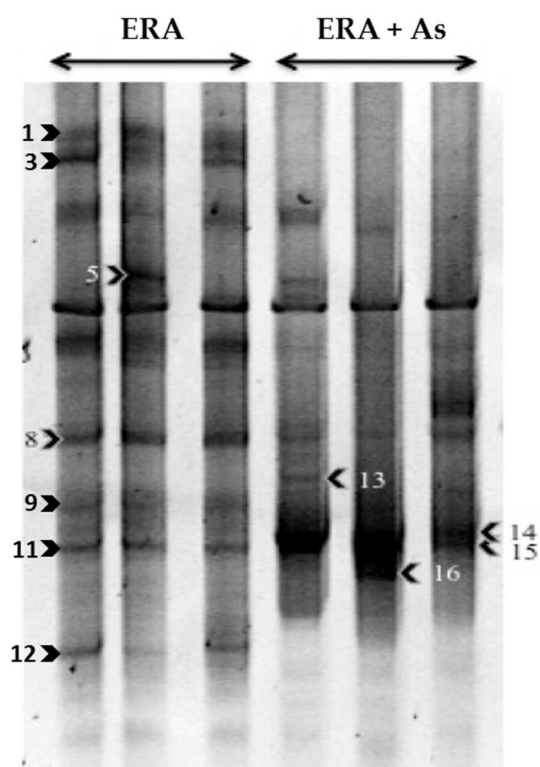


Figure 53 : Profils TTGE des gènes codant l'ARNr 16S obtenus à partir de la communauté incubée pendant six jours en présence d'ERA et d'ERA+ As.

ADNr 16S	ERA (voisin caractérisé le plus proche) (numéro de la bande)	Affiliation phylogénétique	ERA + arsenic (voisin caractérisé le plus proche)	Affiliation phylogénétique
TTGE	<i>Clostridium jejuense</i> (1)	Firmicute	<i>Arthrobacter oxydans</i> (13)	Actinobactérie
	<i>Paenibacillus borealis</i> (12)	Firmicute	<i>Paenibacillus</i> sp. (15)	Firmicute
	<i>Enterobacter</i> sp. (5)	γ-Proteobacteria	<i>Paenibacillus xylanexedans</i> (16)	Firmicute
	<i>Ewingella americana</i> (3)	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i> (14)	γ-Proteobacteria
	<i>Pseudomonas</i> sp. (9)	γ-Proteobacteria		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (11)	γ-Proteobacteria		
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (8)	γ-Proteobacteria		
Isolats	<i>Arthrobacter</i> sp.	Actinobactérie	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobactérie
	<i>Staphylococcus</i> sp.	Firmicute	<i>Achromobacter</i> sp.	β-Proteobacteria
	<i>Acinetobacter</i> sp.	γ-Proteobacteria	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	γ-Proteobacteria
	<i>Enterobacter</i> sp.	γ-Proteobacteria	<i>Enterobacter</i> sp.	γ-Proteobacteria
	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-Proteobacteria	<i>Pantoea agglomerans</i>	γ-Proteobacteria
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	γ-Proteobacteria
	<i>Pseudomonas syringae</i>	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	γ-Proteobacteria
	<i>Serratia</i> sp.	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	γ-Proteobacteria
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>	γ-Proteobacteria
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	γ-Proteobacteria	<i>Pseudomonas syringae</i>	γ-Proteobacteria
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	γ-Proteobacteria	<i>Serratia fonticola</i>	γ-Proteobacteria
			<i>Stenotrophomonas</i> sp.	γ-Proteobacteria

Tableau 21 : Identification des bactéries dans les microcosmes au bout de 6 jours d'incubation par le séquençage des bandes TTGE présentes dans la figure 53 et l'isolement de souches bactériennes

La diversité du gène *ACR3* dans les microcosmes a été déterminée par clonage-séquençage après six jours d'incubation. Les séquences protéiques déduites ont été comparées aux bases de données (Blastx – Tableau 22). Les séquences les plus proches correspondent aux gènes *ACR3* de *Paracoccus* sp. TRP et *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 en absence d'arsenic et *Pseudomonas putida* S16 et *Pseudomonas aeruginosa* 152504 en présence d'arsenic.

Protéine caractérisée la plus proche	No. accession	ERA ^a	ERA + arsenic ^a
arsenical-resistance protein <i>Paracoccus</i> sp. TRP	ZP_08666915.1	4	
arsenical-resistance protein <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	YP_002028368.1	3	
arsenical-resistance protein <i>Pseudomonas putida</i> S16	YP_004704627.1		1
arsenical-resistance protein <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 152504	EGM20754.1		4

^a nombre de clones séquencés

Tableau 22 : Résultats « blastx » du séquençage du gène *ACR3* pour les conditions ERA et ERA + arsenic, après 6 jours d'incubation des microcosmes.

IV.4. DISCUSSION

Dans cette expérience en microcosmes, la toxicité de l'arsenic sur l'activité de la communauté microbienne a de nouveau été mise en évidence. En effet, la minéralisation du carbone en présence de ce métalloïde est plus faible qu'en présence d'ERA seuls. Nous pouvons donc supposer que les populations bactériennes résistantes à l'arsenic ont été sélectionnées et ont mis en place une réponse adaptée. Cette réponse bactérienne a été étudiée *via* la mesure de l'abondance et de l'expression des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* par PCR en temps réel et par RT-PCR en temps réel.

IV.4.1. ABONDANCE RELATIVE DES GENES ETUDIES

Les bactéries possédant les gènes *ACR3* et *arsB* ont été significativement sélectionnées puisque l'abondance de ces gènes est multipliée respectivement par un facteur 25 et 2,9 en présence d'ERA et d'arsenic. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus lors de l'incubation de la communauté bactérienne en milieu liquide (partie III de ce chap. « Résultats »). En effet, dans cette étude, les gènes *ACR3* et *arsB* étaient significativement plus abondants dans les cultures contenant 1 mM d'As(III) que dans celles présentant des concentrations moins

élevées d'As(III) (0 μ M, 10 μ M et 100 μ M). En revanche, les résultats concernant le gène *aioA* divergent entre les deux études. En effet, dans ces microcosmes de sable, *aioA* est 9,5 fois plus abondant en présence d'ERA et d'arsenic qu'en présence d'ERA seuls, alors que l'abondance de ce gène avait tendance à diminuer parallèlement à l'augmentation de la concentration en As(III) dans les cultures en milieu liquide.

IV.4.2. EXPRESSION RELATIVE DES GENES ETUDIES

La méthode d'extraction des ARNm à partir de sable a pu être validée puisque nous sommes parvenus à obtenir des ARNm de bonne qualité et en quantité suffisante pour quantifier l'expression des gènes ciblés. Comme dans l'étude précédente, nous constatons une induction de l'expression des gènes *arsB* et *ACR3*. Cependant, les résultats concernant l'expression du gène *aioA* montrent des divergences entre les deux expériences. En effet, l'expression de *aioA* dans les microcosmes de sable est indétectable en absence d'arsenic. De plus, ce gène présente un niveau d'expression en présence d'arsenic supérieur à celui des deux autres gènes. Rappelons-nous qu'en absence d'As(III) dans les cultures en milieu liquide, le gène *aioA* présentait un niveau de transcription basal relativement élevé, résultant probablement de l'activité d'un gène apparenté à *aioA* de *Pseudomonas* sp. 46. Cette expression basale en absence d'arsenic était susceptible de masquer l'induction des autres gènes *aioA* de la communauté en présence d'arsenic. Dans la présente étude en microcosmes de sable, ce phénomène n'a pas été observé, les bactéries exprimant l'As(III)-oxydase de façon constitutive étant probablement minoritaires dans la communauté. Ceci pourrait expliquer l'induction de transcription des gènes *aioA* par l'arsenic à l'échelle de la communauté, mécanisme fréquemment observé chez les bactéries oxydant l'As(III) (Inskeep *et al.*, 2007 ; Clingenpeel *et al.*, 2009 ; Koechler *et al.*, 2010). Il semble donc que dans un milieu plus complexe se rapprochant des conditions telluriques et favorisant une large diversité microbienne, ce gène pourrait constituer un biomarqueur potentiel du stress arsenic. Il est néanmoins nécessaire de confirmer ce résultat dans d'autres conditions expérimentales. Une meilleure connaissance des mécanismes régulant l'expression des gènes *aioA* est également nécessaire (Slyemi et Bonnefoy, 2012). Il serait notamment intéressant de déterminer si les cas d'expression constitutive sont fréquents chez les bactéries, ce qui conditionne l'utilisation des

ARNm *aioA* en tant que biomarqueurs d'une pollution par l'arsenic d'une part et d'oxydation de l'As(III) et As(V) d'autre part.

IV.4.3. DEVENIR DE L'As(III) ET DE L'As(V) DANS LES MICROCOSMES DE SABLE

L'analyse des teneurs en arsenic total et extractible à l'eau en fin d'incubation suggère des transformations différentes du métalloïde entre les trois réplicats. Les faibles variations du ratio As(V) / As total observées pour les réplicats R1 et R2 durant l'incubation pourraient résulter de faibles activités d'oxydation et de réduction de l'arsenic par la communauté bactérienne. Cependant, les résultats de RT-PCR en temps réel indiquent que les gènes codant l'As(III)-oxydase et les transporteurs d'As(III) sont exprimés, et il est probable que les gènes *arsC* (généralement associés aux gènes *arsB* ou *ACR3* dans les opérons *ars*) codant l'As(V)-réductase le soient également. Dans ce cas, l'absence de transformation apparente de l'arsenic dans les réplicats R1 et R2 serait due à des activités d'oxydation et de réduction globalement équivalentes qui se seraient compensées sur la durée de l'incubation. Le réplicat R3 se distingue des deux microcosmes précédents par une diminution des quantités d'arsenic total extractible à l'eau suggérant qu'une fraction significative de l'arsenic s'est adsorbée ou accumulée dans la biomasse bactérienne (Patel *et al.*, 2007 ; Malik, 2004 ; Mondal *et al.*, 2008). Ainsi, Patel *et al.* (2007) ont mis en évidence par des outils de protéomique que la souche *Pseudomonas* As-1, tolérante à des concentrations très élevées en As(V), pourrait être utilisée dans des processus de bioremédiation puisque cette souche internalise l'arsenic.

Parallèlement, le rapport As(V) / As total diminue sensiblement dans ce réplicat, indiquant une réduction nette de l'As(V) par la communauté microbienne. La réduction d'As(V) par détoxification, i.e. *via* l'As(V)-réductase *ArsC*, peut conduire à des conditions où l'As(III) est l'espèce majoritaire dans des environnements aérobies (Macur *et al.*, 2001 ; Sohrin *et al.*, 1997). En effet, de nombreuses bactéries sont connues pour réduire l'As(V) en condition aérobie (Bachate *et al.* 2009 ; Liao *et al.*, 2011), processus qui peut contribuer à l'établissement de ces conditions de non-équilibre apparent. Dans le cas du réplicat R3, on peut donc supposer que les bactéries réduisant l'arsenic *via* *ArsC* soient numériquement ou métaboliquement majoritaires en comparaison des bactéries oxydant l'As(III). Néanmoins, aucune différence n'est notable en ce qui concerne l'abondance relative des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans les

différents réplicats, après six jours d'incubation. Il en est de même pour l'expression relative des gènes *arsB* et *ACR3* mais pas pour le gène *aioA*, dont l'expression n'est pas détectable dans le réplicat R3. L'hypothèse avancée précédemment est donc cohérente et suggère que les bactéries s'étant développées dans ce batch sont des bactéries As(V)-réductrices. Il est également possible d'envisager la présence de niches anaérobies dans ces microcosmes de sable et l'implication des systèmes Arr de réduction dissimilatrice de l'As(V).

Par la suite, la quantification des gènes *arsC* avec des amorces déjà utilisées en PCR en temps réel (Sun *et al.*, 2004) ou non (Jain *et al.*, 2011 ; Villegas-Torres *et al.*, 2011) et des leurs transcrits permettrait d'apporter un nouvel argument à cette analyse. De plus, il serait pertinent de mesurer les activités enzymatiques de réduction de l'As(V) et d'oxydation de l'As(III) sur des extraits protéiques de communautés bactériennes incubées en présence d'arsenic, afin de mieux comprendre la contribution relative de ArsC et AioA à la spéciation de l'arsenic en conditions aérobies.

IV.4.4. ETUDE DE LA DIVERSITE BACTERIENNE

La diversité taxonomique a été étudiée par TTGE et par isolement de souches bactériennes et la diversité du gène *ACR3* codant les transporteurs d'As(III) a été analysé par clonage-séquençage.

Contrairement à l'expérience en milieu liquide, nous n'avons pas sélectionné que des bactéries apparentées au genre *Pseudomonas*. Il est donc préférable d'utiliser une source de carbone diversifiée pour obtenir une diversité microbienne plus large plutôt que d'utiliser une source de carbone unique tel que le glucose qui, comme nous l'avons constaté dans la partie précédente, a engendré une pression de sélection très importante. Néanmoins, en comparant les profils TTGE du gène codant l'ARNr 16S obtenus sur la communauté incubée en présence d'ERA, et celui de la communauté initiale (inoculum extrait du sol NM-MS par gradient de Nycodenz, fig. 49A - partie III du chap. « Résultats »), il s'avère que l'ajout d'ERA affecte largement la diversité bactérienne si on en juge par le faible nombre de bandes observées dans les profils TTGE en fin d'incubation. Ces résultats sont comparables à ceux de Kozdroj et Van Elsas (2000) qui montrent que l'ajout d'exsudats synthétiques réduit la diversité microbienne et accroît la prédominance des microorganismes copiotrophes.

Les profils TTGE indiquent que l'arsenic a également affecté la structure de la communauté bactérienne, avec une diminution du nombre et/ou de l'intensité de la plupart des bandes majoritaires et l'intensification de deux ou trois bandes en présence du métalloïde, correspondant à des bactéries affiliées aux genres *Pseudomonas* et *Paenibacillus*.

Cavalca *et al.* (2010) ont étudié la communauté bactérienne cultivable associée à la rhizosphère du chardon *Cirsium arvense* (L.) poussant dans des sols contaminés à l'arsenic. A travers cette étude, cette équipe a montré que les isolats résistants à l'arsenic appartenaient à 13 genres bactériens dont les majoritaires sont *Bacillus*, *Achromobacter* ou encore *Brevundimonas*. Parmi ces isolats, la plupart se développent en présence de fortes concentrations en arsenic (supérieures à 100 mM As(V) et 10 mM As(III)) et possèdent les gènes *arsC*, *arsB* et *ACR3*, le génotype *arsB* étant prédominant sur le génotype *ACR3*. Certes les méthodes analytiques sont différentes, mais dans notre cas où la communauté bactérienne a été extraite du sol végétalisé de Neuves-Maisons, ce génotype prédomine bien en absence d'arsenic. En revanche, les génotypes *arsB* et *ACR3* sont équivalents après exposition au métalloïde. Le ribotype *Paenibacillus* identifié par TTGE dans la condition « ERA + arsenic » a déjà été isolé d'un sol contaminé au naphthalène et aux ETM (As = 155.13 ± 0.08 mg kg⁻¹) et ces souches bactériennes résistent à l'As(III) et à l'As(V) (Pepi *et al.*, 2009).

En conclusion, cette expérience a permis de replacer les résultats obtenus en milieu liquide dans un contexte plus proche des conditions *in situ* : les observations réalisées ici tendent à confirmer que l'abondance et l'expression des gènes *aioA*, *arsB* et *ACR3* pourraient être des biomarqueurs pertinents de la pollution en arsenic. Néanmoins, ces résultats restent à confirmer *in situ*, ce qui fera l'objet des expériences décrites dans les deux prochains chapitres.

PARTIE V : DYNAMIQUE DE L'ABONDANCE *IN SITU* DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* DANS UNE TERRE MULTICONTAMINEE

V.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Une partie de l'étude menée dans les parties précédentes concernait l'abondance des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* au sein d'une communauté bactérienne exposée à différentes concentrations en As(III) et à un mélange d'As(III) et d'As(V). Les expériences ont été menées en milieu liquide, de telle manière que la (bio)disponibilité ne soit pas un paramètre limitant et en batch de sable. Toutefois, ces expériences ne reflètent pas les conditions réelles d'un sol, où la toxicité d'un ETM et la réponse des bactéries à cet ETM peuvent être affectées par les caractéristiques du sol et la disponibilité des polluants. Afin de prendre en compte ces nombreux facteurs, ces travaux ont été poursuivis en étudiant des sols présentant des concentrations contrastées en arsenic. Dans cette étude, des échantillons de terre contaminée en HAP mais également en ETM dont l'arsenic (§ I.2. du chapitre « Matériels et Méthodes ») ont été utilisés. Ils proviennent de la station expérimentale du GISFI à Homécourt, et font l'objet d'un projet ANR qui vise à étudier *in situ* et sur le long terme le devenir et l'impact environnemental de la contamination d'un sol. Ainsi, nous avons pu étudier des échantillons de sol prélevés une fois par an depuis 2005. L'objectif principal de cette étude était de quantifier l'abondance des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* et de relier ces données à la teneur en arsenic total, sa fraction mobile et / ou sa fraction échangeable au phosphate de potassium. Cette étude portant sur des échantillons prélevés entre 2005 et 2010 a également permis de prendre en compte la dynamique de l'abondance de ces gènes au cours du temps. De nombreux paramètres biologiques (abondance et diversité de la micro-flore, de la micro-faune et de la méso-faune...), physiques (pH et disponibilité de l'eau...) ou chimiques (concentrations en ETM et en HAP...) ont été mesurés une à deux fois par an sur ces parcelles lysimétriques par les différents partenaires du projet (Biache *et al.*, 2009 ; Ouvrard *et al.*, 2011 ; Cebon *et al.*, 2009 ; Thion *et al.*, 2012). L'extraction d'ADN des échantillons a été réalisée par A. Cébron et C. Thion. Les échantillons de terre prélevés n'ayant pas été stockés

à -80°C au fur et à mesure des prélèvements, nous n'avons pas envisagé une étude de la dynamique transcriptionnelle des gènes cibles.

Les trois modalités correspondant à la terre contaminée de Neuves-Maisons NM-TN (terre nue), NM-VS (végétation spontanée) et NM-MSm (luzerne mycorhizée) ont permis de prendre en compte l'influence de la présence d'une végétation et du type de végétation sur l'abondance des bactéries résistantes à l'arsenic et des bactéries As(III) – oxydantes dans ces dispositifs. Il a en effet déjà été montré que les bactéries As(III)-oxydantes isolées de la rhizosphère du chardon *Cirsium arvense* (L.) étaient majoritairement plus abondantes que les bactéries As(V)-réductrices certainement afin de protéger cette plante (Cavalca *et al.*, 2010). La question est donc de savoir s'il en est de même pour l'abondance des différentes bactéries résistantes à l'arsenic habitant un sol végétalisé. La modalité TD-MSm (terre thermo-désorbée, luzerne mycorhizée) permettait de considérer l'influence d'un traitement drastique de remédiation, la thermo-désorption, sur ces communautés ce qui, à notre connaissance, n'a jamais fait l'objet d'études relatives à une pollution arsénisée.

V.2. DEMARCHE EXPERIMENTALE

La démarche expérimentale est schématisée dans la figure 54.

∞ L'ADN extrait des échantillons de sols contaminés à l'As, prélevés des 4 parcelles lysimétriques de chaque traitement NM-TN, NM-VS, NM-MSm et TD-MSm aux temps T0 (septembre 2005), T2 (septembre 2006), T4 (septembre 2007), T6 (septembre 2008), T8 (septembre 2009) et T10 (septembre 2010) a été analysé par PCR en temps réel pour quantifier les gènes d'intérêt.

∞ Les teneurs en arsenic total ont été analysées (Laboratoire d'analyses, INRA Arras) et étaient disponibles sur le site intranet du GISFI pour ces parcelles mais uniquement pour les prélèvements T2, T4, T8 et T10. Ces valeurs sont répertoriées dans la figure 58.

∞ Afin d'aborder la (bio)disponibilité de l'arsenic, les échantillons de sol prélevés des parcelles lysimétriques NM-TN(10), NM-VS(3), NM-MSm(14) et TD-MSm(13) aux temps T0, T2, T4, T6, T8 et T10 ont été sélectionnés (figure 54). Les fractions d'arsenic extractibles à l'eau et échangeables au phosphate de potassium ont été analysées à partir de ces échantillons de sol (2 g) par ICP-OES (§ III.6. du chap. « Matériels et Méthodes »).

Entre les prélèvements T4 et T6, les parcelles NM-TN, NM-MSm et TD-MSm ont été retournées puis les parcelles NM-MSm et TD-MSm ont été replantées.

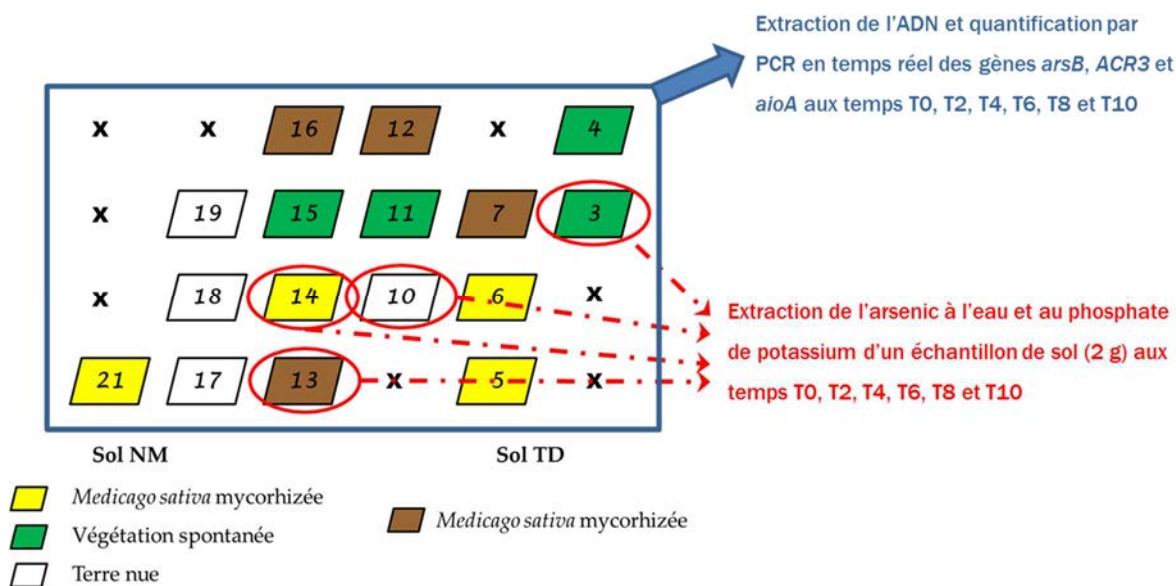


Figure 54 : Démarche expérimentale pour l'étude in situ et à long terme de l'abondance des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans un sol multi-contaminé

V.3. RESULTATS

V.3.1. ABONDANCE RELATIVE DES GENES *arsB* ET *ACR3* DANS LES PARCELLES EXPERIMENTALES AU COURS DU TEMPS ET EN FONCTION DES TRAITEMENTS

Le nombre de copies des gènes *arsB* et *ACR3* a été rapporté à celui du gène codant l'ARNr 16S pour estimer la proportion de bactéries possédant ces gènes au sein de la communauté bactérienne et pour normaliser ces résultats. Les figures 55 et 56 montrent l'évolution de la proportion de bactéries possédant respectivement les gènes *arsB* et *ACR3*, depuis la mise en place du dispositif expérimental *in situ* en 2005 jusqu'en 2010 et pour les modalités étudiées NM-TN, NM-VS, NM-MSm et TD-MSm. Une ANOVA à deux facteurs (XLStat 2011) a été réalisée pour évaluer l'effet du temps et des différentes modalités sur l'abondance de ces gènes et cela en tenant compte des données de quantifications réalisées à T0. Il s'agit d'analyses statistiques entre les parcelles sans traitement thermique NM-TN, NM-VS et NM-MSm d'une part et entre les parcelles NM-MSm (sans traitement thermique) et TD-MSm

(avec traitement thermique) d'autre part. Il est important de noter que l'abondance relative de l'ADNr 16S ne varie pas significativement au cours du temps.

V.3.1.1. Impact du temps et de la végétation sur l'abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3*

∞ L'abondance relative du gène *arsB* est significativement plus importante dans les parcelles NM-TN que dans les parcelles végétalisées NM-MSm mais cette abondance est similaire entre les parcelles NM-TN et NM-VS (Figure 55). L'analyse statistique montre un effet inhibiteur et significatif de la présence de végétation, plus précisément de la luzerne, mais en revanche pas d'effet du facteur temps. De même, l'interaction des deux facteurs n'est pas significative ($p = 0,170$).

∞ Pour le gène *ACR3*, l'abondance relative est significativement plus élevée dans les parcelles non plantées NM-TN que dans les deux types de parcelles présentant une végétation NM-VS et NM-MSm (Figure 56). L'ANOVA montre aussi un effet significatif du temps avec une augmentation de l'abondance relative du nombre de copies de ce gène après 3 ans (T6) puis une diminution après 4 ans (T8) et une nouvelle augmentation après 5 ans (T10). Un effet significatif entre le paramètre-végétation et le paramètre-temps est à noter avec une p -value inférieure à 0,0001.

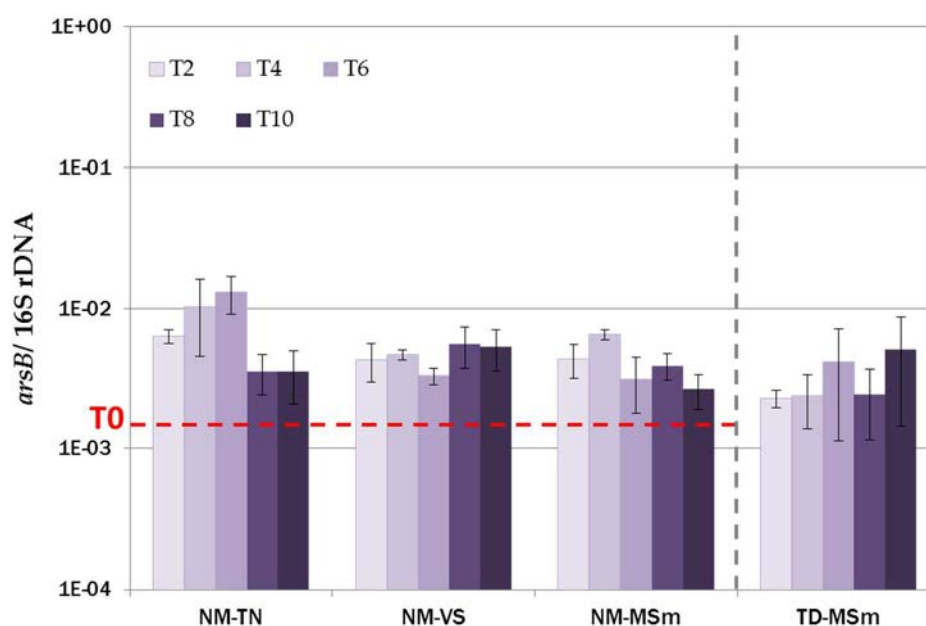
V.3.1.2. Impact de la thermo-désorption sur l'abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3*

Au temps initial T0, les gènes *arsB* et *ACR3* ne sont pas détectables mais leur abondance a considérablement augmentée et cela dès le prélèvement T2 c'est-à-dire au bout d'un an.

∞ L'abondance relative du gène *arsB* ne varie significativement pas entre les parcelles NM-MSm et TD-MSm et ceci n'évolue pas au cours du temps (Figure 55).

∞ Le sol traité par désorption thermique présente toutefois une abondance relative du gène *ACR3* significativement plus faible que celle de la terre non traitée mais cette différence n'est observable qu'au bout de 3 ans (Figure 56). En effet, au début du dispositif expérimental c'est-à-dire aux prélèvements T2 et T4, l'abondance de ce gène était similaire dans les parcelles NM-MSm et TD-MSm. Le paramètre temps a un effet significatif avec une

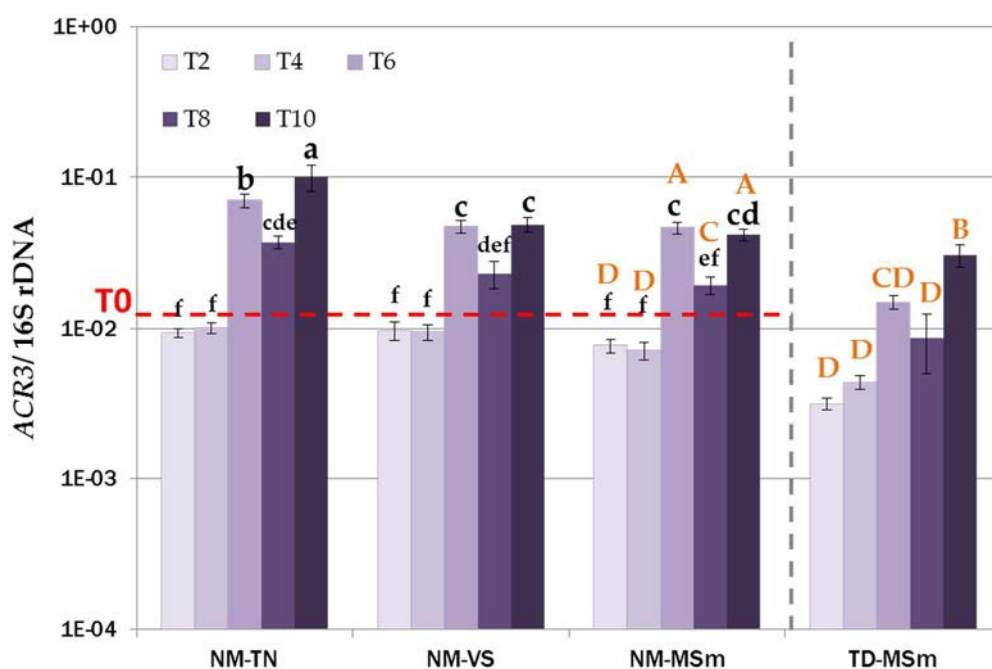
augmentation de l'abondance de ce gène au bout de 3 ans et, de plus, l'interaction de ces deux facteurs joue un rôle ($p = 0,000$).



Effet du temps	<i>p</i> -value
NM - MSm	0,563
TD - MSm	
NM - VS	
NM - TN	0,255
NM - MSm	

Effet du traitement	<i>p</i> -value	NM-TN	NM-VS	NM-MSm	TD-MSm
Thermo-désorption	0,234				
Végétation	0,046	A	AB	B	

Figure 55 : Nombre de copies de gène *arsB* rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10). $T0 = 2,14 \cdot 10^{-3}$. Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de l'interaction des deux facteurs n'a été observé. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls.



Effet du temps	p-value	T0	T2	T4	T6	T8	T10
NM - MSm	<0,0001	BC	C	C	A	B	A
TD - MSm							
NM - VS	<0,0001	C	C	C	A	B	A
NM - TN							
NM - MSm							

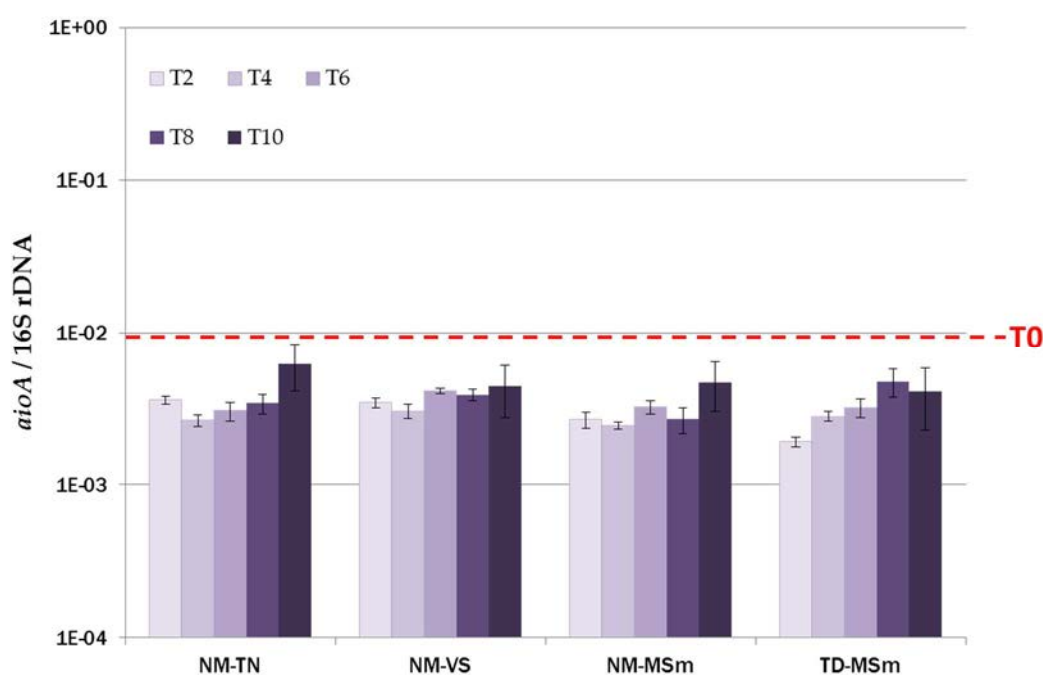
Effet du traitement	p-value	NM-TN	NM-VS	NM-MSm	TD-MSm
Thermo-désorption	<0,0001			A	B
Végétation	<0,0001	A	B	B	

Figure 56 : Nombre de copies de gène ACR3 rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10). $T0 = 1,19 \cdot 10^{-2}$. Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. L'interaction des deux facteurs a un effet significatif (p -value = 0.000 pour NM-MSm / TD-MSm et p -value < 0.0001 pour NM-VS / NM-TN / NM-MSm). Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls.

V.3.2. ABONDANCE RELATIVE DU GÈNE *aioA* DANS LES PARCELLES EXPERIMENTALES AU COURS DU TEMPS ET EN FONCTION DES TRAITEMENTS

L'abondance relative du gène *aioA* a également fait l'objet de cette étude et les résultats sont présentés dans la figure 57. Il s'agit ici de cibler les bactéries susceptibles d'oxyder l'As(III), forme mobile, en As(V), forme plus facilement piégée sur les phases minérales des sols. Le tableau présenté dans la figure 57 résume, de la même manière que pour les gènes *arsB* et

ACR3, les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Il montre qu'il y a un effet significatif du temps sur cette abondance puisque les bactéries possédant le gène *aioA* étaient significativement plus abondantes au moment de la mise en place des parcelles lysimétriques (T0) que lors des prélèvements effectués par la suite, et l'abondance relative du gène ne varie alors plus avec le temps. En revanche, il n'y a pas d'effet des traitements, que ce soit la présence de végétation ou la thermo-désorption, sur l'abondance du gène *aioA*. L'effet de l'interaction des paramètres (traitement * temps) est inexistant ($p = 0,816$ pour l'analyse NM-TN, NM-VS et NM-MSm et $p = 0,729$ pour l'analyse NM-MSm et TD-MSm).



Effet du temps	<i>p</i> -value	T0	T2	T4	T6	T8	T10
NM - MSm	0,000	A	B	B	B	B	B
TD - MSm							
NM - VS	<0,0001	A	B	B	B	B	B
NM - TN							
NM - MSm							

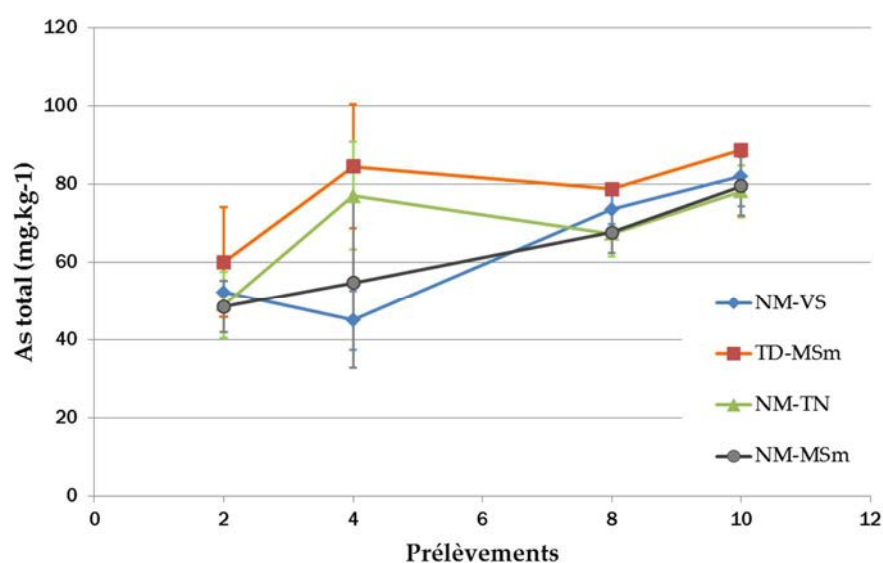
Effet du traitement	<i>p</i> -value
Thermo-désorption	0,452
Végétation	0,149

Figure 57 : Nombre de copies de gène *aioA* rapporté au nombre de copies de gène ADNr 16S dans les parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) à T0, et après 1 (T2), 2 (T4), 3 (T6), 4 (T8) et 5 années (T10). $T0 = 9,7.10^{-3}$. Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de l'interaction des deux facteurs n'a été observé. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls.

V.3.3. QUANTIFICATION DE L'ARSENIC TOTAL, MOBILE ET/OU DISPONIBLE DANS LES TERRES DES PARCELLES LYSIMETRIQUES

V.3.3.1. Arsenic total

La figure 58 représente les teneurs en arsenic total (mg.kg^{-1} de sol) dans les échantillons de sol et leur évolution au cours du temps, du prélèvement T2 au prélèvement T10. Ces valeurs sont disponibles dans l'annexe 3.



Effet du temps	p-value	T2	T4	T8	T10
NM - MSm TD - MSm	0,000	C	B	AB	A
NM - VS NM - TN NM - MSm	<0,0001	D	C	B	A

Effet du traitement	p-value	NM-TN	NM-VS	NM-MSm	TD-MSm
Thermo-désorption	0,001			B	A
Végétation	0,248				

Figure 58 : Evolution de la concentration d'arsenic dans la terre des parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) après 1 (T2), 2 (T4), 4 (T8) et 5 années (T10) (Analyses INRA Arras, données GISFI). Les données en arsenic concernant les prélèvements T0 et T6 ne sont pas disponibles. Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de l'interaction des deux facteurs n'a été observé. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls.

Une hétérogénéité de la concentration en arsenic total est observée dans les parcelles d'un même traitement malgré le fait qu'il s'agit d'un échantillon moyen par parcelle. Par ailleurs,

les concentrations en arsenic total augmentent significativement au cours du temps. En effet, en 2006, il y avait entre 45 et 60 mg d'arsenic par kg de sol et en 2010, ces quantités se situaient entre 78 et 90 mg.kg⁻¹. Il n'y a pas d'effet de la végétation mais les teneurs en arsenic total sont significativement plus élevées dans la terre traitée par thermo-désorption TD-MSm que dans la terre non traitée NM-MSm.

V.3.3.2. Fractions d'arsenic et d'antimoine mobiles et disponibles dans les parcelles lysimétriques

Afin de doser la fraction mobile d'arsenic présente dans les parcelles lysimétriques, la fraction extractible à l'eau a été analysée (§ III.6.1. du chap. « Matériels et Méthodes »). Afin d'avoir une estimation de la (bio)disponibilité de l'arsenic dans ces parcelles, nous avons appliqué le protocole d'échange de l'arsenic au phosphate de potassium (§ III.6.2. du chapitre « Matériels et Méthodes »). En ce qui concerne la démarche expérimentale (Figure 54), seules les parcelles NM-TN(10), NM-VS(3), NM-MSm(14) et TD-MSm(13) ont été ciblées. Pour chaque parcelle analysée, la fraction d'arsenic extractible à l'eau dosée par ICP-OES se situait en dessous du seuil de détection c'est-à-dire 5 ppb tout comme les fractions en Sb extractibles à l'eau et au phosphate de potassium. En revanche, les valeurs obtenues en ce qui concerne l'arsenic échangeable au phosphate de potassium sont présentées dans le tableau 23. Ces résultats n'ont pas fait l'objet d'analyses statistiques puisqu'il n'y a pas eu de répétitions expérimentales.

	As (mg.kg ⁻¹)					
	2005	2006	2007	2008	2009	2010
NM-VS(3)	7,47	8,88	8,13	9,84	10,5	9,38
TD-MSm(13)	14,84	17,56	16,03	14,81	14,84	15,00
NM-TN(10)	6,91	7,00	7,41	8,78	9,00	7,22
NM-MSm(14)	7,34	8,03	8,25	8,56	8,66	7,94

Tableau 23 : Quantités d'arsenic extrait au phosphate de potassium dans les parcelles NM-TN(10), NM-VS(3), NM-MSm(14) et TD-MSm(13) de 2005 à 2010.

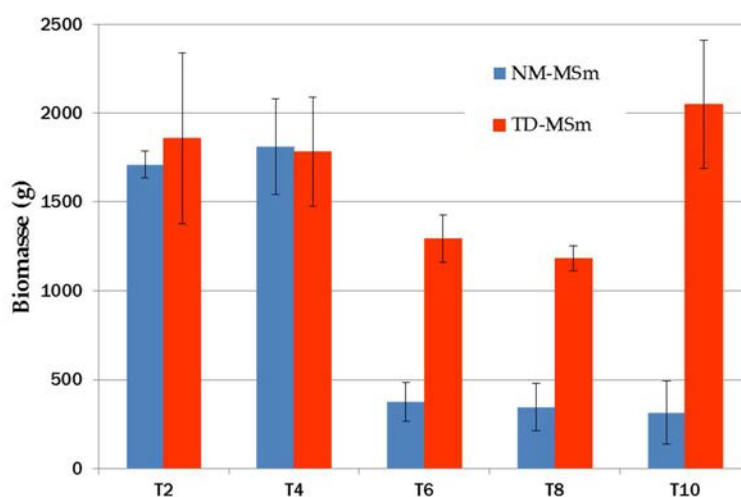
La fraction échangeable au phosphate de potassium est plus importante dans la parcelle contenant la terre de Neuves-Maisons traitée par thermo-désorption (TD-MSm(14)) que dans

les parcelles de terre non traitée (Tableau 23). Cette fraction est même deux fois supérieure à celle correspondant aux parcelles NM surtout lors des premiers prélèvements (T2 et T4).

V.3.4. CORRELATIONS ENTRE LES ABONDANCES RELATIVES DES GENES ET LES DIFFERENTS PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARCELLES LYSIMETRIQUES

Nous avons cherché d'éventuelles corrélations entre l'abondance relative des gènes *arsB*, *ACR3*, *aioA* et l'ADNr 16S et les teneurs en arsenic total et en arsenic échangeable au phosphate de potassium, la biomasse végétale et le phosphore disponible. L'évolution de la biomasse végétale est présentée dans la figure 59, l'évolution du phosphore disponible est présentée dans la figure 60 et les corrélations entre l'ensemble de ces facteurs sont répertoriées dans le tableau 24.

Seules les biomasses de luzerne des parcelles NM-MSm et TD-MSm sont évaluées et ont pu être utilisées pour les prélèvements T2, T4, T6, T8 et T10. Nous pouvons constater que la biomasse de luzerne a significativement chuté entre les prélèvements effectués en 2007 (T4) et 2008 (T6) pour rester faible dans les parcelles NM-MSm et pour augmenter en 2010, au moment du prélèvement T10, dans le cas des parcelles TD-MSm (Figure 59).

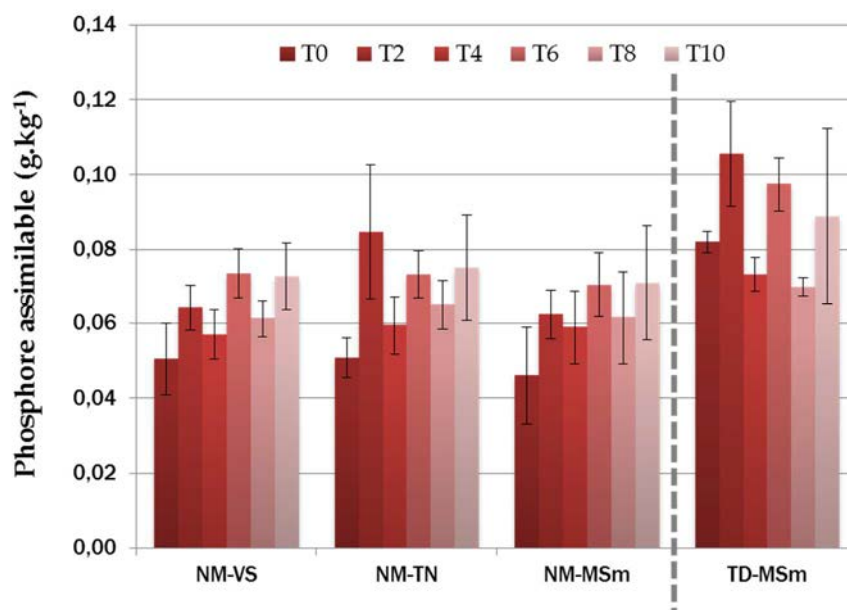


Modalité	p-value	T2	T4	T6	T8	T10
NM-MSm	< 0,0001	A	A	B	B	B
TD-MSm	0,005	AB	AB	B	B	A

Figure 59 : Evolution de la biomasse (luzerne) dans les parcelles NM-MSm et TD-MSm de 2006 à 2010.

Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à un facteur. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls.

Les données du GISFI correspondant aux analyses des quantités de phosphore assimilable (P_2O_5 en $g.kg^{-1}$) pour chaque parcelle et pour chacun des prélèvements sont présentées dans la figure 60. Les concentrations en phosphore assimilable sont significativement plus importantes dans les parcelles contenant le sol ayant subi le traitement par désorption thermique (TD-MSm). Nous observons un effet du temps mais la tendance de cet effet ne peut pas être totalement définie puisque ces concentrations augmentent puis diminuent successivement au cours des différents prélèvements.



Facteur	p-value	Effet					
Traitement	< 0,0001	NM-VS (b)	NM-MSm (b)	NM-TN (b)	TD-MSm (a)		
Temps	< 0,0001	T0 (b)	T2 (a)	T4 (b)	T6 (a)	T8 (b)	T10 (a)

Figure 60 : Evolution des concentrations de phosphore assimilable (P_2O_5) dans les parcelles NM-VS, NM-TN, NM-MSm et TD-MSm de 2005 à 2010 (Données du GISFI). Le tableau présente les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Aucun effet de l'interaction des deux facteurs n'a été observé. Les lettres entre parenthèses correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls.

Les tests de corrélation de Pearson soulignent l'existence d'un lien entre l'abondance relative des gènes ADNr 16S, *ACR3* et *aioA* et la teneur en arsenic total dans l'ensemble des parcelles (Tableau 24). Ces corrélations sont positives et significatives contrairement au gène *arsB*, dont l'abondance n'est pas corrélée à cette quantité d'arsenic total. De plus, aucune corrélation n'est observée entre l'abondance relative de ces gènes et les fractions d'arsenic échangeable au phosphate de potassium et aucun lien n'a pu être mis en évidence entre ces abondances relatives et les concentrations en phosphore assimilable.

Néanmoins, les données de biomasse des parcelles NM-MSm et l'abondance relative du gène *ACR3* sont corrélées négativement avec un coefficient de corrélation de $-0,592$ et une p -value inférieure à $0,0001$. L'augmentation de l'abondance relative de ce gène peut donc être mise en corrélation avec la diminution de la biomasse.

Différents paramètres	Caractéristiques des analyses statistiques	Coefficient de corrélation de Pearson			
		16S	arsB	ACR3	aioA
ARSENIC TOTAL	Ensemble des parcelles aux temps T2, T4, T8 et T10	0,462 ^{0,000}	0,003	0,335 ^{0,007}	0,284 ^{0,023}
ARSENIC ECHANGEABLE	Parcelles NM-VS3, NM-TN10, NM-MSm14 et TD-MSm13 aux temps T2, T4, T6, T8 et T10	0,292	- 0,264	- 0,339	- 0,081
BIOMASSE VÉGÉTALE	Parcelles NM-MSm et TD-MSm aux temps T2, T4, T6, T8 et T10	- 0,011	0,061	- 0,592 ^{< 0,0001}	- 0,215
PHOSPHORE DISPONIBLE	Ensemble des parcelles aux temps T2, T4, T6, T8 et T10	- 0,037	- 0,074	0,041	- 0,108

Tableau 24 : Test de corrélation de Pearson entre l'abondance relative des gènes bactériens et les différents paramètres mesurés dans les parcelles lysimétriques. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs dont la corrélation est significative et les valeurs en exposant correspondent aux différentes valeurs de p.

V.4. DISCUSSION

Bien que le sol étudié de Neuves-Maisons ne soit pas extrêmement pollué en arsenic (45 à 90 mg.kg⁻¹), sa concentration est supérieure à celle tolérée en Allemagne (7 à 40 mg kg⁻¹ ; Brandstetter *et al.*, 2000) et voisine de celle tolérée en France sur les sites industriels selon le ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (environ 120 mg.kg⁻¹ ; Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, 2000).

Dès le début de la mise en place du dispositif expérimental du GISFI, les gènes codant les pompes d'efflux ArsB et ACR3p et l'arsénite-oxydase AioA sont présents dans ces échantillons de terre contaminée en HAP et en ETM. Les populations bactériennes indigènes présentent donc le potentiel génétique pour résister à l'arsenic et à l'antimoine. Il est difficile de comparer ces données d'abondance de gènes avec d'autres études car, à notre connaissance, aucune étude n'a quantifié ces gènes dans des sols ou des sédiments auparavant. A travers cette étude, nous souhaitons suivre l'évolution de ces gènes au cours du temps, c'est-à-dire durant 5 ans dans le cadre de cette étude, et en fonction de différents traitements de végétalisation et de thermo-désorption.

Au moment du lancement du dispositif expérimental (T0), ces abondances relatives atteignent les ratios de $2,14.10^{-3}$ pour le gène *arsB*, $1,19.10^{-2}$ pour le gène *ACR3* et $9,7.10^{-3}$ pour le gène *aioA*. Le fait que le gène *ACR3* soit le gène le plus abondant dans ces terres multicontaminées sera discuté dans le chapitre suivant.

V.4.1. IMPACT DE LA VEGETATION SUR L'ABONDANCE RELATIVE DES GENES

D'un point de vue de l'abondance relative des gènes codant les pompes d'efflux *ArsB* et *ACR3* et contrairement à l'abondance relative des gènes *aioA*, la présence de végétation sur les parcelles semble être un paramètre influent. Cet effet est principalement observé dans le cas de l'abondance du gène *ACR3*, abondance plus importante dans les parcelles de terre nue (NM-TN) que dans les parcelles contenant de la luzerne mycorhizée (NM-MSm) ou sur lesquelles la végétation se développe de manière non contrôlée (NM-VS). Le gène *arsB* est, lui aussi, plus abondant dans les parcelles NM-TN que dans les parcelles NM-MSm mais aucune différence n'est observable entre les parcelles NM-TN et NM-VS. Il est important de souligner que sur ce même dispositif expérimental et pour la période allant de 2005 (T0) à 2007 (T4), le nombre de copies de gènes 16S a augmenté la première année puis s'est stabilisé dans tous les traitements, indiquant une adaptation de la communauté bactérienne au site expérimental (Cebbron *et al.*, 2009). Le nombre de copies de gènes des bactéries à Gram négatif impliqués dans la biodégradation des HAP (les principaux polluants de ces sols) a aussi augmenté pour les parcelles végétalisées, et leur abondance relative s'est maintenue au cours du temps, alors qu'elle a diminué dans les parcelles nues (Cebbron *et al.*, 2009). L'ensemble de ces résultats montrent un effet positif de la présence de plantes sur la communauté bactérienne, qui est bien connu (Lynch, 1991) et un effet positif sur certaines communautés fonctionnelles (Cebbron *et al.*, 2009) mais pas sur d'autres et, selon cette étude, pas sur les gènes fonctionnels de résistance à l'As. En 2012, Thion *et al.* ont aussi souligné un effet positif de la végétation sur l'abondance de la communauté fongique dans les parcelles de ce dispositif expérimental.

Dans la mesure où les abondances relatives des gènes *arsB* et *ACR3* varient en fonction de la présence de végétation, celles-ci ont été reliées à la biomasse de luzerne présente sur les parcelles correspondantes NM-MSm et TD-MSm afin d'infirmier ou de confirmer nos précédents résultats. Les résultats indiquent que seul le gène *ACR3* est corrélé négativement à la biomasse végétale avec un coefficient de corrélation voisin de $-0,592$ ($p < 0,0001$).

Le fait que la biomasse, pour les deux modalités NM-MSm et TD-MSm, a chuté significativement au temps T6, c'est-à-dire au moment où l'abondance relative du gène *ACR3* a considérablement augmenté, est surprenant et n'a pas été expliqué. En revanche, un

paramètre important ne doit pas être négligé : les parcelles NM-MSm et TD-MSm ont été re-inoculées avec des champignons mycorhiziens (*Glomus mosseae* et *Glomus intraradices*) entre les temps T4 (2007) et T6 (2008). Les luzernes des parcelles TD-MSm étaient bien mycorhizées par la suite mais la colonisation était plus faible pour les parcelles NM-MSm (MULTIPOLSITE, C. Leyval, communication personnelle).

Cette différence de colonisation mycorhizienne pourrait contribuer à expliquer la différence de biomasse entre TD-MSm et NM-MSm à partir de 2008 (T6). En effet, les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) qui favorisent la nutrition minérale des plantes, notamment en phosphore faiblement disponible (Requena, 2005), et augmentent leur biomasse (Smith et Read, 2008) peuvent donc être bénéfiques à une plante hôte évoluant dans des conditions défavorables ou polluées. De récentes études révèlent que les plantes terrestres, adaptées aux sols contaminés par l'arsenic, sont colonisées par les AMF (Chen *et al.*, 2007 ; Leung *et al.*, 2006, 2007 ; Wu *et al.*, 2007) et développent une tolérance à l'arsenic (Gonzales-Chavez *et al.*, 2002). Ces champignons pourraient réduire l'influx de l'As(V) dans les racines des plantes (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2002), et réduire l'As(V) en As(III) en pompant l'As(III) hors des cellules fongiques (Sharpley *et al.*, 2000 a et b). Au temps T6, les teneurs en As dans les parties aériennes des luzernes étaient plus faibles dans les parcelles TD-MSm que dans les parcelles NM-MSm (MULTIPOLSITE, C. Leyval, communication personnelle). Liu *et al.* (2005) ont montré une diminution de la concentration en arsenic mais une augmentation de la quantité en arsenic dans la fougère *Pteris vittata* colonisée par un AMF due à l'augmentation de la biomasse. Le ratio As(III)/As(V) indiquait que les plants de riz *Oryza sativa* mycorhizés par *G. intraradices* immobilisaient plus d'As(III) dans les racines et pouvaient prévenir la transformation d'As(III) en As(V) (Chen *et al.*, 2012).

Ces résultats suggèrent que les interactions entre les bactéries résistantes à l'As et les champignons mycorhiziens mériteraient d'être considérées, en relation avec leur effet sur la mobilité et le transfert d'As à la plante.

V.4.2. CORRELATION ENTRE L'ABONDANCE RELATIVE DES GENES, L'ARSENIC TOTAL ET ECHANGEABLE DANS LES PARCELLES ET LE PHOSPHORE ASSIMILABLE

L'analogie structurale entre l'arséniate et le phosphate permet l'entrée d'As(V) dans les cellules bactériennes par les transporteurs membranaires de phosphate (Willsky et Mallamy, 1980). Parallèlement, le phosphate est connu pour inhiber par compétition l'entrée d'As(V) dans la cellule chez de nombreux organismes (Slaughter *et al.*, 2012). Ainsi, le rapport entre les teneurs en phosphate et As(V) dans le milieu est susceptible d'influer l'impact de l'arsenic sur les communautés du sol. Ces paramètres méritaient d'être étudiés et mis en relation avec l'abondance de gènes de résistance à l'arsenic.

L'analyse des teneurs en phosphore disponible (Olsen) des parcelles n'a pas mis en évidence de corrélation avec l'abondance des gènes *ACR3* et *arsB*. De même, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'abondance des gènes ADN_r 16S, *ACR3*, *arsB* et *aioA* et la fraction d'arsenic échangeable au phosphate de potassium. En revanche, d'une manière surprenante, les gènes ADN_r 16S, *ACR3* et *aioA* sont corrélés de manière significative avec les teneurs en arsenic total mesurées dans les parcelles lysimétriques, avec toutefois des coefficients de corrélation relativement faibles (respectivement 0,462, 0,335 et 0,284). Il semblerait donc que plus il y a d'arsenic dans les sols, plus les bactéries totales et les bactéries possédant les gènes *ACR3* et *aioA* sont abondantes. Ces observations nous amènent à penser que, dans la mesure où la fraction d'arsenic extractible à l'eau est non détectable et que ces concentrations en arsenic ne sont pas très élevées, l'arsenic présent dans les terres de Neuves-Maisons est fortement fixé aux particules solides du sol et les bactéries ne ressentent donc pas ou peu sa toxicité. Cette hypothèse sera testée dans le chapitre suivant sur un sol fortement pollué à l'arsenic avec des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 7700 mg.kg⁻¹ d'arsenic soit environ 100 fois plus élevées que celles présentes dans les terres des parcelles lysimétriques.

▲ La conclusion principale de cette étude, qui a aussi suivi la diversité et les activités biologiques du sol à travers une large gamme de bioindicateurs (protozoaires, nématodes, microarthropodes...) et des paramètres fonctionnels tels que les activités enzymatiques et la respiration du sol est que l'abondance des organismes et les activités augmentent avec la

présence de végétation (Cebbron *et al.*, 2011). Les résultats obtenus sur les gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic ne vont pas dans ce sens.

Dans cette étude, les abondances des gènes *arsB* et *ACR3* ne semblent pas être des biomarqueurs de la biodisponibilité de l'arsenic, en admettant que cette biodisponibilité puisse être évaluée par des extractions chimiques. Toutefois, ces terres de Neuves-Maisons sont des terres multi-contaminées dans lesquelles l'arsenic est associé à de forts taux d'autres ETM comme Zn, Cd, Pb, mais aussi à de fortes concentrations en HAP (Ouvrard *et al.*, 2011). Ainsi, l'effet de l'As n'est pas dissociable de celui des autres contaminants présents. Par ailleurs, les concentrations en As étaient relativement faibles et variaient peu entre les traitements et au cours du temps. D'autres sols, présentant des concentrations plus variables méritent donc d'être étudiés.

PARTIE VI : ABONDANCE DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* **DANS DES MICROCOSMES DE SOL EN FONCTION DE LA** **CONCENTRATION EN ARSENIC**

VI.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Dans les parties précédentes, la réponse transcriptionnelle des bactéries possédant les gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* a été étudiée dans des systèmes simplifiés de type culture en batch en milieu liquide et dans les microcosmes avec du sable (cf parties III et IV du chap. « Résultats »). L'évolution de l'abondance de ces trois gènes a été suivie sur une période de 5 années dans des échantillons de sol provenant des parcelles lysimétriques de la station expérimentale d'Homécourt (cf partie V du chap. « Résultats »). Il n'a pas été possible d'analyser la réponse transcriptionnelle des bactéries directement dans le sol provenant de ce dispositif. Il nous semblait donc important d'étudier l'expression des gènes cibles, cette fois-ci, dans des systèmes plus complexes que les batchs, comme des microcosmes de sol. Pour caractériser au mieux la réponse transcriptionnelle des bactéries et évaluer la robustesse de notre méthode d'analyse par RT-PCR en temps réel, nous avons ciblé les sols de la friche industrielle d'Auzon (43) présentant une pollution essentiellement métallique (Pb, As, Sb) et des teneurs en arsenic (bio)disponibles variables.

L'objectif était, à partir d'échantillons de sol couvrant une large gamme de concentrations en arsenic et en antimoine, d'étudier les liens éventuels entre l'abondance et l'expression des gènes cibles et les teneurs totales et/ou les fractions échangeables au phosphate de potassium de l'arsenic et de l'antimoine dans ces microcosmes. Nous souhaitions ainsi déterminer si la communauté bactérienne indigène pouvait répondre de manière dose-dépendante à la fraction disponible d'arsenic et d'antimoine. Deux modalités avec addition ou non d'une source de carbone ont également été comparées afin de déterminer si cette réponse nécessitait une stimulation de la communauté microbienne.

VI.2. ABONDANCE DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* DANS DES MICROCOSMES DE SOLS COUVRANT UNE LARGE GAMME DE CONCENTRATIONS EN ARSENIC

VI.2.1. DEMARCHE EXPERIMENTALE

Les microcosmes de sols du site Auzon (25 g) (§ I.1.2. du chap. « Matériels et Méthodes ») ont été mis en place à partir de sol frais prélevé directement sur différentes zones de ce site et stocké à 4°C. Nous n'avons pas souhaité sécher préalablement les échantillons de sol pour éviter de perturber les communautés bactériennes et modifier les caractéristiques du sol. L'humidité résiduelle en eau à 60°C de ces échantillons de sol a été mesurée afin de connaître le volume de liquide à ajouter pour amener ces sols à 80 % d'humidité.

Des échantillons des quatre sols sélectionnés ont été répartis en trois réplicats dans des flacons. Nous connaissions les teneurs en arsenic total mesurées par fluorescence X à l'aide d'un analyseur portable NITON (Tableau 2 du chap. « Matériels et Méthodes »). Cependant, ces teneurs ont été vérifiées par dosage par ICP-OES sur les sols broyés (§ III.3. du chap. « Matériels et Méthodes »). Les sols sélectionnés sont les sols 4 (zone B), 6 (zone A), 9 et 10 (zone C) couvrant une gamme de concentrations en arsenic s'étendant d'environ 200 µg / g de sol à environ 7700 µg / g de sol. Nous avons analysé, pour chacun de ces sols, les paramètres physico-chimiques suivants en utilisant les méthodes décrites dans les paragraphes III.1., III.2., III.4. et III.6. du chapitre « Matériels et Méthodes » :

- le pH,
- la teneur en matière organique (g / kg de sol),
- l'humidité résiduelle à 60°C (g / kg de sol)
- les concentrations d'arsenic extractibles à l'eau et au phosphate de potassium.

La démarche expérimentale est schématisée dans la figure 61 et les prélèvements ont été effectués après deux jours d'incubation à 24°C sans agitation. Nous avons suivi, par PCR en temps réel, l'évolution du nombre de copies des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* et des gènes codant l'ARNr 16S ainsi que leur expression au sein de la communauté.

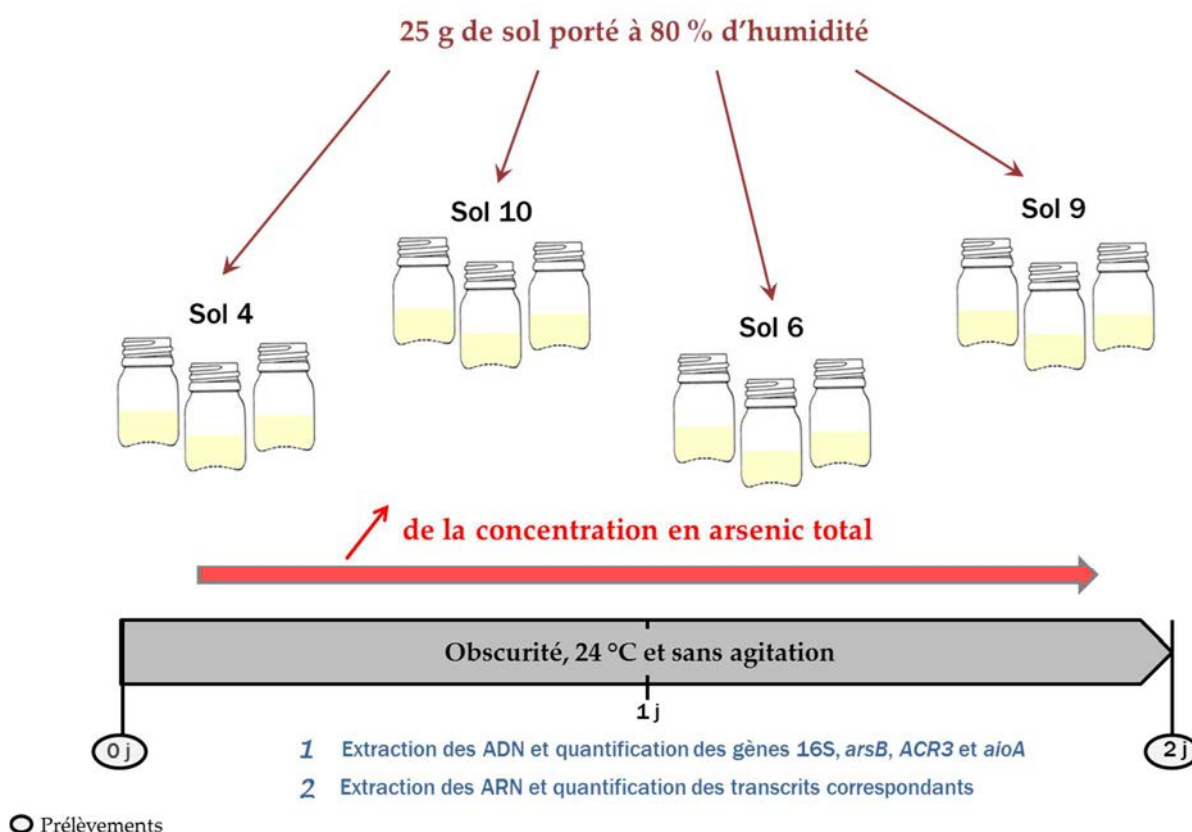


Figure 61 : Microcosmes des sols d'Auzon 4, 6, 9 et 10 pour l'étude de la réponse d'une communauté bactérienne à l'arsenic après un ajout d'eau et une incubation à 24°C pendant 2 jours.

VI.2.2. RESULTATS

VI.2.2.1. Fractions d'arsenic disponible dans les échantillons de sol d'Auzon

Le tableau 25 témoigne de l'hétérogénéité de la pollution à l'arsenic présente sur le sol du site d'Auzon. En effet, le pH, la quantité de matière organique et l'humidité résiduelle à 60°C sont proches pour chacun des sols, mais les quantités de matière organique et l'humidité résiduelle à 60°C sont plus élevées dans les échantillons des sols 9 et 10 prélevés dans la zone D. En revanche, les quantités d'arsenic extractible à l'eau et au phosphate de potassium varient et couvrent une large gamme de (bio)disponibilité en arsenic.

Numéro de l'échantillon de sol (zone de prélèvement)	pH	Matière organique (g/kg)	Humidité résiduelle (g/kg)	Arsenic total (µg/g)	Arsenic extractible à l'eau (µg/g) (%disponibilité)	Arsenic extractible au phosphate de potassium (µg/g) (% disponibilité)
2 (C)	5,2	83,2	165,8	354	5 (1,5)	192 (54,5)
4 (C)	4,8	79,5	139,4	266	0,8 (0,3)	67 (25,5)
6 (A)	4,9	98,1	131,6	2853	149 (5,2)	1330 (46,6)
9 (D)	4,5	148,1	210,7	7733	334 (4,3)	3008 (31,9)
10 (D)	5,1	160,2	220,0	1718	50 (2,9)	439 (25,57)

Tableau 25 : Paramètres physico-chimiques et teneurs en arsenic des sols 2, 4, 6, 9 et 10 utilisés dans cette étude

VI.2.2.2. Quantification des gènes *arsB*, *ACR3*, *aioA* et codant l'ARNr

16S dans les sols

Les figures 62 et 63 montrent les résultats issus de la quantification des gènes après deux jours d'incubation des sols 4, 6, 9 et 10. L'abondance du gène codant l'ARNr 16S a considérablement augmenté, passant d'environ 10^5 copies à environ 10^8 copies par gramme de sol dans les quatre sols testés (Figure 62). Ainsi, malgré des différences importantes de teneur en arsenic entre ces quatre sols, la quantité de bactéries était du même ordre de grandeur dans les sols bruts et a augmenté de manière similaire en deux jours d'incubation.

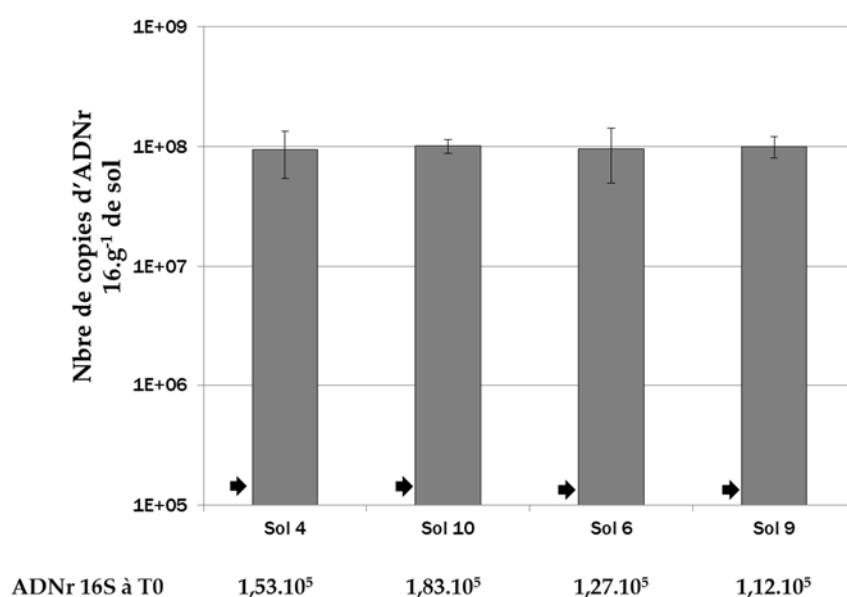


Figure 62 : Nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S par gramme de sol dans les sols 4, 6, 9 et 10 après deux jours d'incubation. Les flèches en noires correspondent aux nombres de copies du gène codant l'ARNr 16S par gramme de sol au temps initial T0. Les valeurs sont indiquées en dessous de chaque colonne de l'histogramme.

A contrario, l'abondance des gènes *arsB* et *ACR3* n'augmente pas au cours du temps comme indiqué dans la figure 63. La proportion de bactéries portant ces gènes n'a donc pas été modifiée malgré l'apparente stimulation de croissance de la communauté bactérienne du sol durant l'incubation. Enfin, l'abondance relative du gène *aioA* augmente sensiblement au cours du temps, les ratios *aioA*/ADNr 16S passant d'environ 5.10^{-3} à environ 5.10^{-2} copies de gènes par copie d'ADNr 16S après deux jours d'incubation.

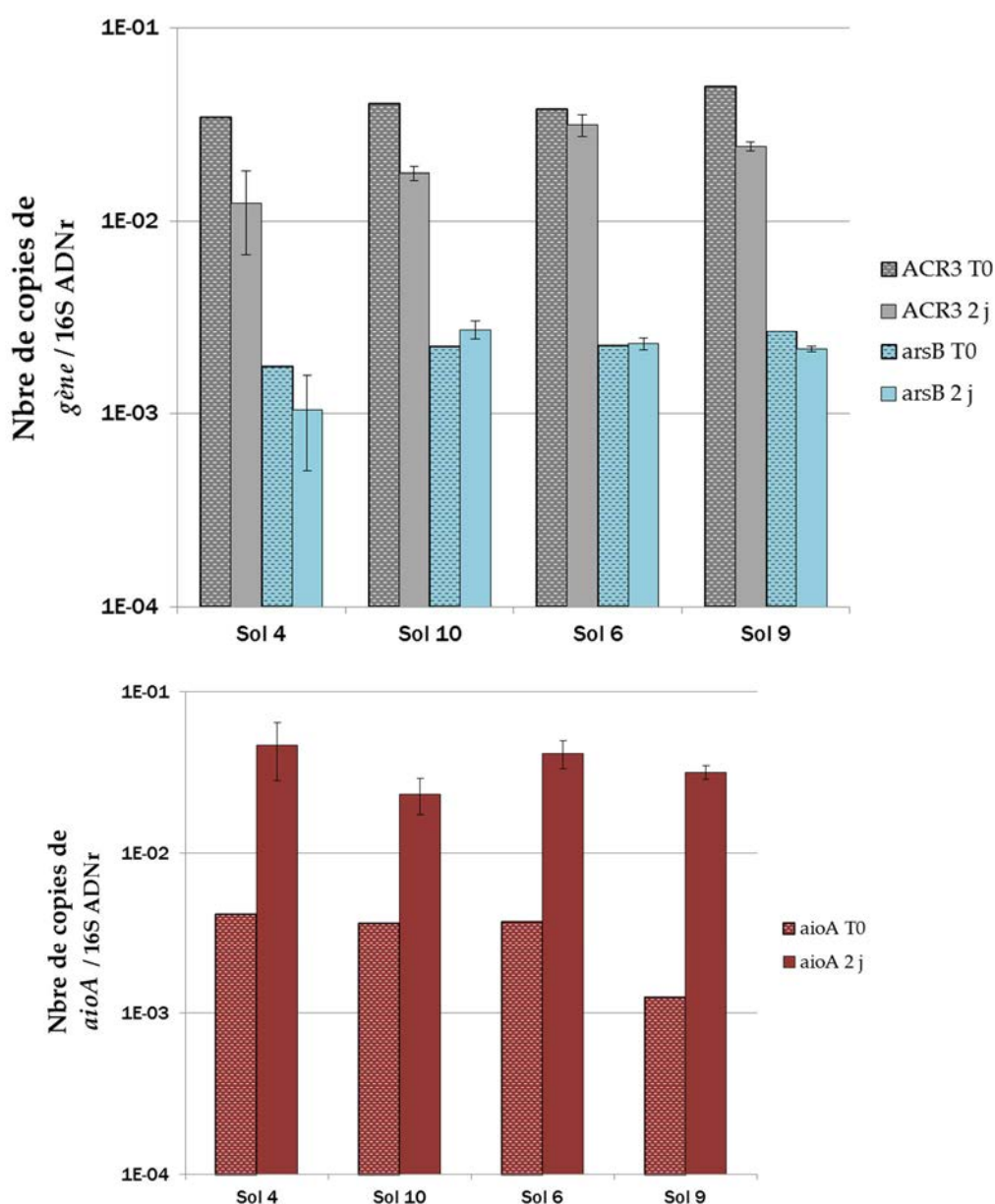


Figure 63 : Nombre de copies des gènes *arsB*, *ACR3* (histogramme du haut) et *aioA* (histogramme du bas) rapporté au nombre de copies de gène codant l'ARNr 16S dans les incubations des sols 4, 6, 9 et 10, au temps initial T0 et après deux jours d'incubation.

VI.2.2.3. Comparaison de deux protocoles d'extraction des ARN

Nous avons extrait l'ARN des sols afin de quantifier l'expression des gènes codant l'ARNr 16S, *arsB*, *ACR3* et *aioA*. Dans un premier temps, le protocole d'extraction des ARN totaux du sol avec le kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » a été suivi (§ IV.3.1. du chap. « Matériels et Méthodes »). Des ARNr 16S ont été amplifiés et quantifiés comme le montre la figure 64. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à quantifier l'expression des gènes fonctionnels à partir de ces extraits d'ARN totaux.

C'est pour cette raison qu'une autre méthode d'extraction des ARN (Monard *et al.*, 2011) a été employée (§ IV.3.2. du chap. « Matériels et Méthodes »). La figure 64 indique que les deux méthodes donnent des résultats de quantification des ARNr 16S comparables pour deux sols seulement, alors que des variations de un à deux ordres de grandeur sont observées pour les sols 6 et 9. De même qu'avec le kit d'extraction FastRNA Pro Soil, cette seconde approche n'a pas permis de quantifier l'expression des gènes fonctionnels, les extraits d'ARN ne contenant probablement pas d'ARNm en quantité et/ou qualité suffisante.

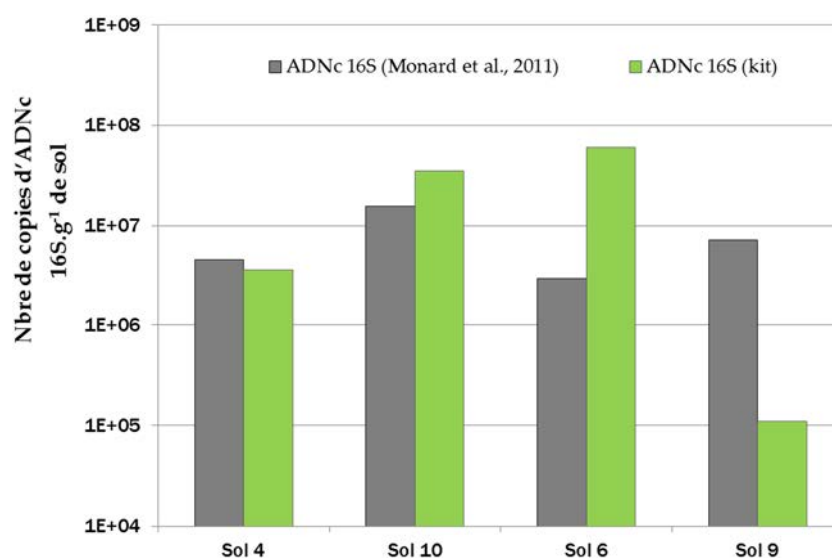


Figure 64 : Nombre de copies d'ARNr 16S (extraits en suivant le protocole de Monard *et al.*, 2011 et le protocole du kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » (MP Biomedicals)) par gramme de sol après deux jours d'incubation des sols 4, 6, 9 et 10.

La concentration et la pureté des ARN totaux ont été comparées pour ces deux protocoles d'extraction (Tableau 26). Les concentrations en ARN totaux sont similaires mais les ratios de densités optiques à 260 nm et 280 nm (DO260 / DO280) différents. Un échantillon d'ARN est généralement reconnu comme pur pour des ratios proches de 2 et nous remarquons que les ARN extraits par la méthode de Monard *et al.*, 2011 présentent des ratios très inférieurs à ce

standard. Les ratios mesurés pour les ARN extraits par le kit sont également différents de ce standard mais ce paramètre sera abordé dans la discussion de ce chapitre.

Echantillons ARN totaux provenant des sols :	(Kit MP Biomedicals)	(Monard <i>et al.</i> , 2011)
	Concentration (ng / µl)	
4	3,8	2
6	13,2	26,7
9	4,5	3,9
10	4,1	5,8
	Ratio 260 / 280	
4	1,45	0,8
6	2,29	1,7
9	1,18	1,28
10	2,27	1,53

Tableau 26 : Concentration en ARN et ratio 260/280 obtenus après extraction des ARN totaux des incubations de sols 4, 6, 9 et 10 pendant 48 h, en suivant les protocoles de Monard et al., 2011 et du kit « FastRNA Pro Soil – Direct Kit » (MP Biomedicals).

VI.3. ABONDANCE DES GENES *arsB*, *ACR3* ET *aioA* DANS DES MICROCOSMES DE SOLS STIMULES PAR L'AJOUT DE CITRATE

VI.3.1. DEMARCHE EXPERIMENTALE

Lors d'une étude sur la transformation et la mobilisation de l'arsenic dans des sols pollués par des cendres de pyrite (résidus d'oxyde de fer), Corsini *et al.* (2010) ont testé l'impact de la présence de glucose sur ces processus. Le but de ces travaux était d'étudier la dynamique temporelle de la communauté bactérienne et l'effet de son activité sur le potentiel redox du sol et sur la solubilisation de l'arsenic et du fer dans des systèmes expérimentaux submergés en présence ou en absence de glucose. Les conclusions majeures de ces recherches sont que, dans ces conditions d'étude, la présence de cette source de carbone améliore l'activité bactérienne et entraîne une diminution du potentiel redox ce qui conduit à une libération de fortes quantités d'arsenic, de fer et de manganèse dans la phase aqueuse. Un an plus tard, avec la mise en place de microcosmes similaires, cette équipe a montré que la quantité d'arsenic libéré était significativement plus importante ($p < 0,01$) en présence de citrate qu'en

présence de glucose (Corsini *et al.*, 2011). Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser le citrate comme source de carbone exogène. La concentration de citrate utilisée était alors 0,23 % (w/w) ce qui équivalait à environ 0,8 mg de carbone par gramme de sol. Pour notre expérience, nous avons fixé la concentration à 0,15 % (w/w) soit 0,5 mg de carbone par gramme de sol afin de ne pas provoquer une sélection bactérienne trop importante.

Le ratio C/N des échantillons de sol est, en moyenne, voisin de 12. Afin de ne pas modifier ce ratio, nous avons ajouté aux microcosmes 0,04 mg d'azote par gramme de sol sous forme de nitrate d'ammonium, soit 0,012 % (w/w).

Pour cette expérience, nous avons choisi les sols 9 et 2 présentant des niveaux contrastés de contamination par l'arsenic, (respectivement 7700 ppm et 350 ppm). Le sol 4, utilisé dans la partie VI.2. de ce chapitre, n'a pas été retenu comme sol « témoin » contenant une faible quantité en arsenic en raison de son hydrophobicité apparente. Les capacités totales de rétention en eau (100 %) des échantillons de sol ont été mesurées (39,95 % et 44,83 % d'eau pour les sols 2 et 9, respectivement) afin de connaître le volume de liquide à ajouter pour amener ces sols à 80 % de leurs capacités de rétention en eau).

Ces échantillons de sols ont été répartis dans les flacons afin de mettre en place les 4 conditions de l'expérience présentées ici :

- « Sol 2-NS » et « Sol 9-NS » : 25 g de sol 2 et de sol 9 non stimulés, sans ajout de citrate ni de nitrate d'ammonium ;
- « Sol 2-S » et « Sol 9-S » : 25 g de sol 2 et de sol 9 stimulés, supplémentés par du citrate (0,15 % (w/w)) et du nitrate d'ammonium (0,012 % (w/w)).

Ces microcosmes ont été réalisés en trois réplicats dans des flacons indépendants correspondant aux différents temps de prélèvement (1, 2, 4 et 12 jours), ce qui amène à un total de 48 flacons.

La démarche expérimentale est schématisée dans la figure 65 et les flacons ont été successivement récupérés après 1, 2, 4 et 12 jours, après avoir mesuré la production de CO₂ afin de suivre la minéralisation du carbone pour les différents microcosmes (§ II.3.2. du chap. « Matériels et Méthodes »). Une aliquote (5 g) de chaque microcosme a été placée à -80°C afin d'extraire les ARN ultérieurement, le reste des échantillons de sol étant placé à -20°C pour extraire les ADN et quantifier les fractions d'arsenic et d'antimoine totales extractibles à l'eau et échangeables au phosphate de potassium (§ III.6. du chap. « Matériels et Méthodes »). L'évolution du nombre de copies des gènes codant l'ARNr 16S, *arsB*, *ACR3* et *aioA* a été

suivie, ainsi que leurs cinétiques d'expression au sein de la communauté bactérienne, par PCR en temps réel.

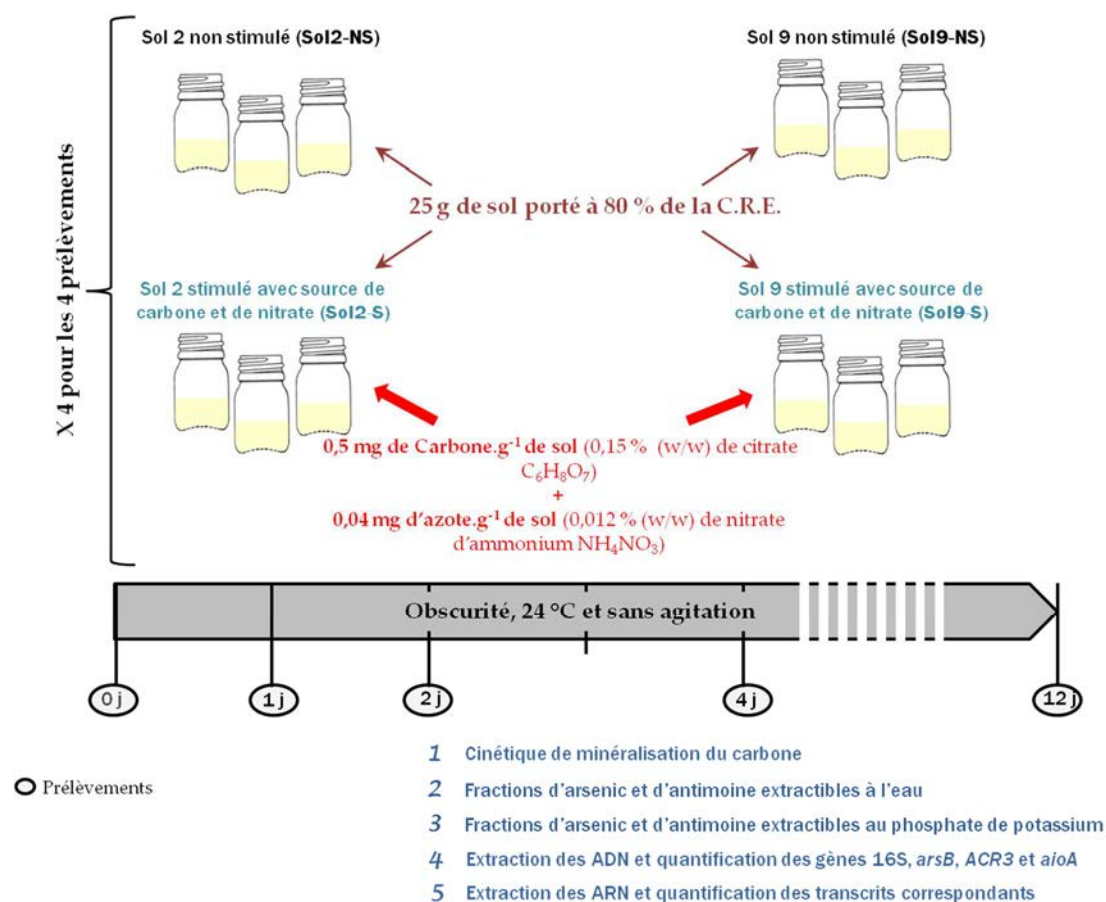


Figure 65 : Microcosmes des sols d'Auzon 2 et 9 pollués à l'arsenic pour l'étude de la réponse d'une communauté bactérienne à l'arsenic avec ou sans stimulation par ajout de citrate et de nitrate d'ammonium.

VI.3.2. RESULTATS

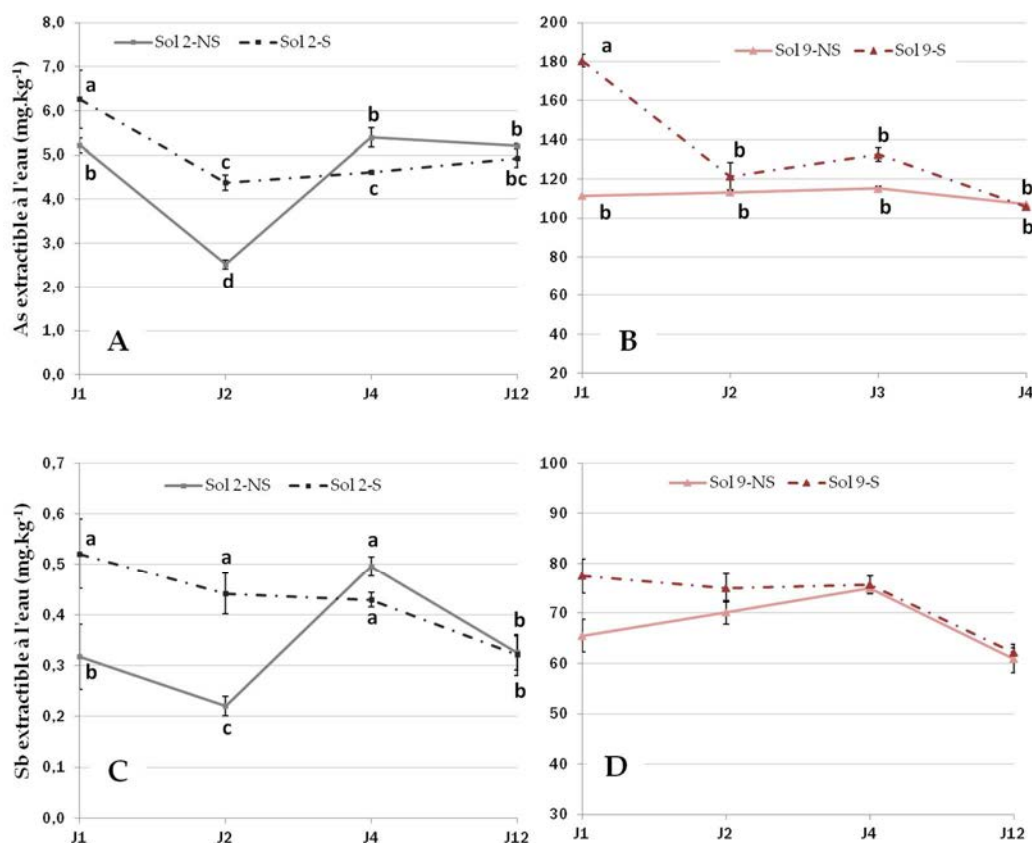
VI.3.2.1. Evolution de la (bio)disponibilité de l'arsenic et de l'antimoine

Afin d'évaluer la (bio)disponibilité de l'arsenic et de l'antimoine dans les microcosmes au cours du temps, nous avons analysé les fractions d'antimoine et d'arsenic extractibles à l'eau (Figure 66). Nous avons également appliqué le protocole d'échange de l'arsenic et de l'antimoine avec le phosphate de potassium dont les résultats sont résumés dans la figure 67.

- La libération de l'arsenic dans la phase aqueuse est très rapide, indépendamment de la quantité d'arsenic présente dans le sol. Un jour d'incubation est suffisant pour libérer la plus

importante fraction d'arsenic et cette tendance est vraie surtout dans les microcosmes stimulés par la source de carbone. Ensuite cette fraction a tendance à diminuer tout au long de l'expérience.

- La fraction d'antimoine extractible à l'eau dans les microcosmes « Sol 2-S » et « Sol 2-NS » est significativement influencée par l'ensemble des paramètres de l'expérience. En effet, l'apport de la source de carbone exogène favorise le passage de l'antimoine dans la phase aqueuse à J1 et J2 mais cet effet s'atténue avec le temps puisque les quantités de Sb extractible à l'eau dans les deux modalités sont équivalentes après quatre jours d'incubation. En ce qui concerne le sol 9, nous ne remarquons aucun effet du citrate sur la fraction d'antimoine disponible, qui a tendance à diminuer au bout de 12 jours d'incubation dans l'ensemble des microcosmes stimulés ou non.



Caractéristique (a)	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Présence d'une source de carbone	0,001	A	B		
	0,001			A	B
Effet du temps	p-value	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	< 0,0001	A	C	B	B
Sol 2-NS					
Sol 9-S	< 0,0001	A	B	B	C
Sol 9-NS					

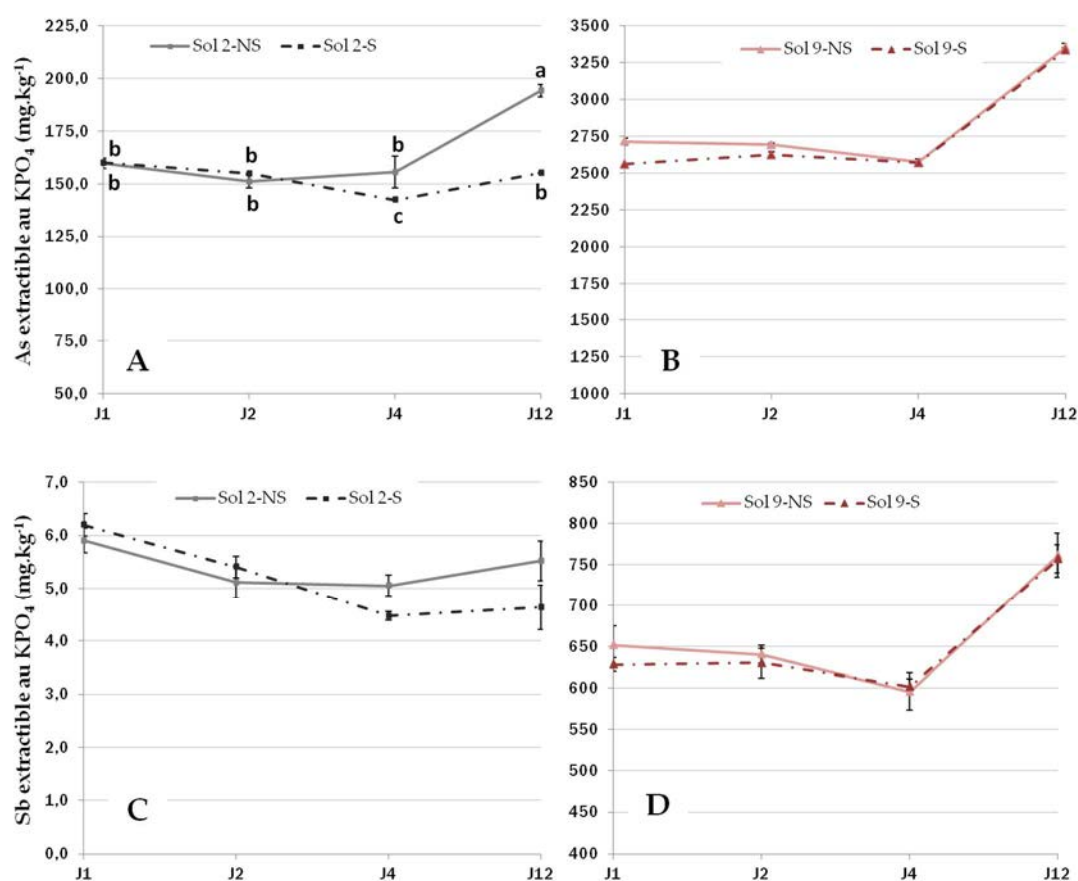
Caractéristique (b)	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Présence d'une source de carbone	< 0,0001	A	B		
	0,171			/	/
Effet du temps	p-value	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	< 0,0001	A	B	A	B
Sol 2-NS					
Sol 9-S	0,002	A	A	A	B
Sol 9-NS					

Figure 66 : Evolution au cours du temps des fractions d'arsenic (graphiques A et B) et d'antimoine (graphiques C et D) extractibles à l'eau dans les microcosmes des sols 2 et 9, stimulés et non stimulés.

Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs (Tableau a : arsenic et tableau b : antimoine). Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls et les lettres situées sur les courbes indiquent que pour le groupe ciblé, il existe un effet de l'interaction des facteurs ($p < 0,0001$).

La fraction d'arsenic échangeable au phosphate de potassium (figure 67) augmente au cours du temps dans les microcosmes de sol 2 stimulés. Dans le sol 9, cette fraction augmente également au cours du temps mais de façon parallèle dans les microcosmes stimulés ou non. Il s'agit donc d'une tendance inverse à la tendance observée pour la fraction extractible à l'eau.

La fraction d'antimoine échangeable au phosphate de potassium n'est influencée que par le facteur temps dans les microcosmes stimulés ou non et mis en place avec les sols 2 ou 9, comme nous pouvons le constater dans la figure 67. Pour les modalités « Sol 2-NS » et « Sol 2-S », cette fraction d'antimoine diminue avec le temps, contrairement au processus observé dans les microcosmes « Sol 9-NS » et « Sol 9-S » dans lesquels la fraction d'antimoine échangeable au phosphate de potassium augmente sensiblement en fin d'incubation.



Caractéristique (a)	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Présence d'une source de carbone	< 0,0001	B	A		
	0,107			/	/
Effet du temps	p-value	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	< 0,0001	B	C	C	A
Sol 2-NS					
Sol 9-S	< 0,0001	B	B	B	A
Sol 9-NS					

Caractéristique (b)	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Présence d'une source de carbone	0,064	/	/		
	0,290			/	/
Effet du temps	p-value	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	< 0,0001	A	B	C	BC
Sol 2-NS					
Sol 9-S	< 0,0001	B	B	C	A
Sol 9-NS					

Figure 67 : Evolution au cours du temps des fractions d'arsenic (graphiques A et B) et d'antimoine (graphiques C et D) échangeables au phosphate de potassium dans les microcosmes des sols 2 et 9, stimulés et non stimulés. Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs (Tableau a : arsenic et tableau b : antimoine). Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls et les lettres situées sur les courbes indiquent que pour le groupe ciblé, il existe un effet de l'interaction des facteurs ($p < 0,0001$).

VI.3.2.2. Activité microbienne dans les microcosmes de sols

L'activité microbienne a été suivie durant l'incubation des microcosmes à travers la minéralisation du carbone (Figure 68). La production de CO₂ est considérablement moins importante dans les microcosmes dans lesquels aucune source de carbone exogène ni d'azote n'a été ajoutée (« Sol 2-NS » et « Sol 9-NS ») par rapport aux microcosmes stimulés (« Sol 2-S » et « Sol 9-S »). Nous pouvons également constater que, pour une même condition expérimentale, la minéralisation du carbone est plus importante dans le sol 2 que dans le sol 9.

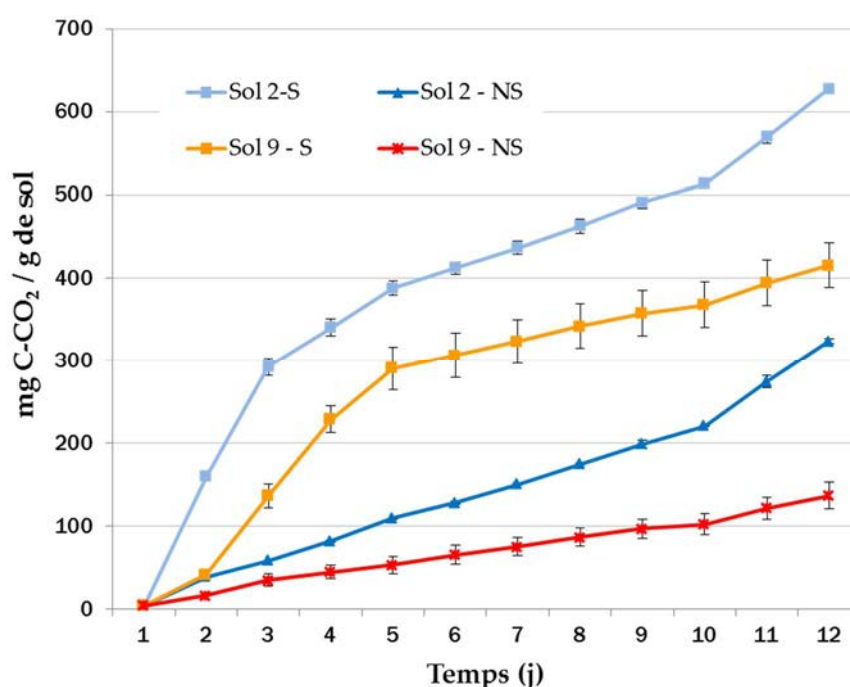


Figure 68 : Evolution de la minéralisation du carbone, correspondant à la production de CO₂, au cours des incubations des microcosmes de sols d'Auzon « Sol 2-S », « Sol 2-NS », « Sol 9-S » et « Sol 9-NS ».

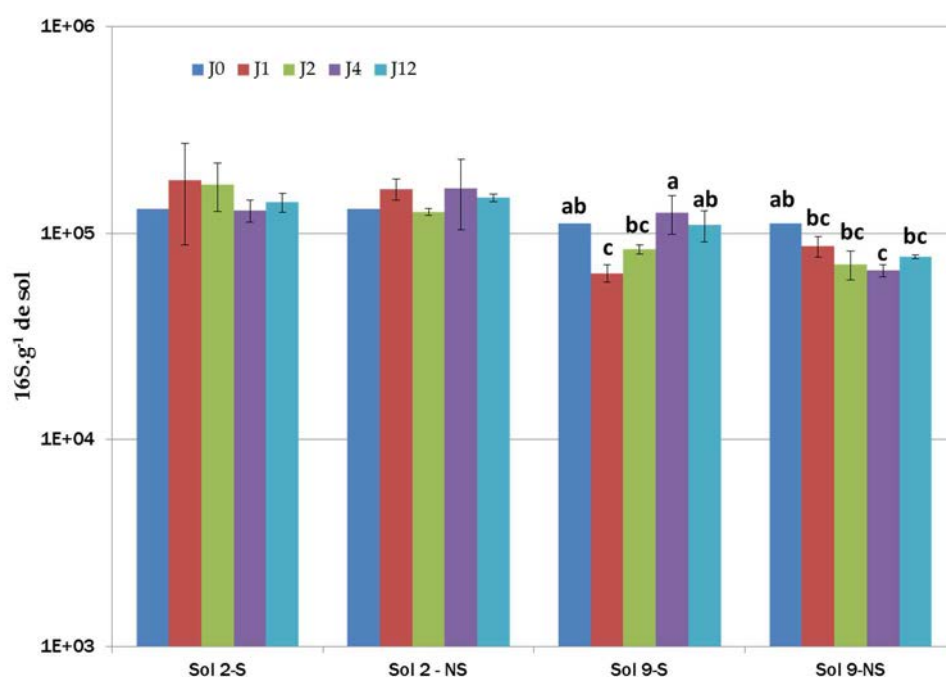
VI.3.2.3. Quantification de la communauté bactérienne totale

Dans un premier temps, nous avons évalué les quantités de bactéries dans les différents microcosmes de sol à travers la quantification des gènes codant l'ARNr 16S (figure 69). Cette analyse a pour objectif de savoir si les différents paramètres comme la teneur en arsenic des sols, l'apport d'une source de carbone et/ou le temps d'incubation à 24°C jouent un rôle significatif dans la croissance des bactéries initialement présentes dans ces échantillons de sol. Plusieurs observations peuvent être faites à ce niveau:

- Globalement, le sol 9 fortement contaminé présente une plus faible densité de populations que le sol 2. En effet, la forte teneur en arsenic du sol 9 joue un rôle sur

l'abondance bactérienne, qui est moins importante dans les microcosmes « Sol 9-NS » et « Sol 9-S » par rapport aux microcosmes « Sol 2-NS » et « Sol 2-S ».

- Le nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S est globalement plus important dans les microcosmes stimulés par le citrate dans le sol 9, contrairement au sol 2 pour lequel la densité des bactéries est similaire dans les deux conditions.
- Pour terminer, le facteur temps joue un rôle dans les microcosmes « Sol 9-S » puisque la quantité de gènes codant l'ARNr 16S diminue à J1-J2 puis augmente à partir de J4 pour revenir à son niveau initial en fin d'incubation. L'effet de l'interaction des deux facteurs (temps / source de carbone) est marqué uniquement dans le sol 9 avec une communauté bactérienne plus importante dans le microcosme « Sol 9-S » à J4 que dans le microcosme « Sol 9-NS » à partir de J1.



Caractéristique	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Concentration en arsenic	0,002	A		B	
	< 0,0001		A		B
Ajout d'une source de carbone	0,994	/	/		
	0,008			A	B

Effet du temps	p-value	0 j	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	0,886	/	/	/	/	/
Sol 2-NS						
Sol 9-S	0,005	A	B	B	A	A
Sol 9-NS (*)						
Sol 2-NS	0,118	/	/	/	/	/
Sol 9-NS						
Sol 2-S	0,638	/	/	/	/	/
Sol 9-S						

Figure 69 : Abondance relative du gène codant l'ARNr 16S dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.

Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Newman-Keuls. (*) indique que pour ce groupe, il existe un effet de l'interaction des facteurs reporté par les lettres sur l'histogramme du dessus.

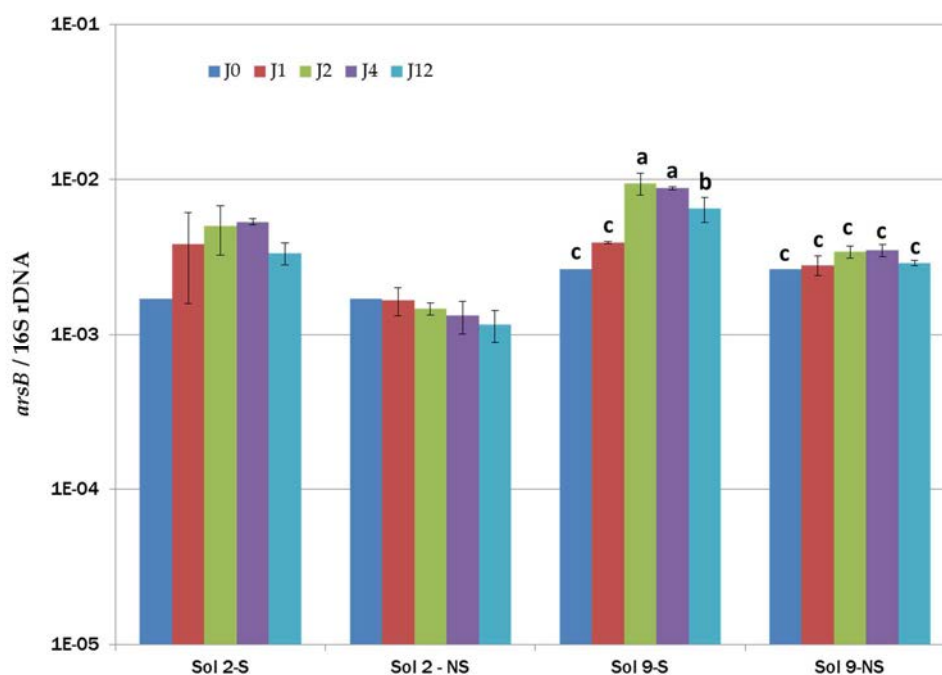
VI.3.2.4. Proportion de bactéries résistantes à l'arsenic

VI.3.2.4.1. Quantification des gènes codant les pompes

d'efflux de l'arsénite

La figure 70 synthétise les résultats de quantification du gène *arsB* au cours du temps dans l'ensemble des microcosmes :

- La proportion de bactéries possédant le gène *arsB* est significativement plus importante dans les microcosmes de sol 9 fortement contaminé, indépendamment de l'apport d'une source de carbone et d'azote.
- De plus, l'ajout de citrate et de nitrate d'ammonium stimule les populations bactériennes portant le gène *arsB* dans les microcosmes « Sol 2-S » et « Sol 9-S ».
- L'effet du temps est marqué dans le sol 9, qu'il soit stimulé ou non, ainsi que dans les sols 2 et 9 stimulés d'après les analyses statistiques. La figure montre cet effet du temps de manière prononcée dans les microcosmes « Sol 9-S » et « Sol 2-S », au sein desquels la proportion de bactéries possédant le gène *arsB* augmente significativement après 2 jours d'incubation pour diminuer en fin d'incubation.



Caractéristiques	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Concentration en arsenic	0,000	B		A	
	0,0001		B		A
Présence d'une source de carbone	< 0,0001	A	B		
	< 0,0001			A	B

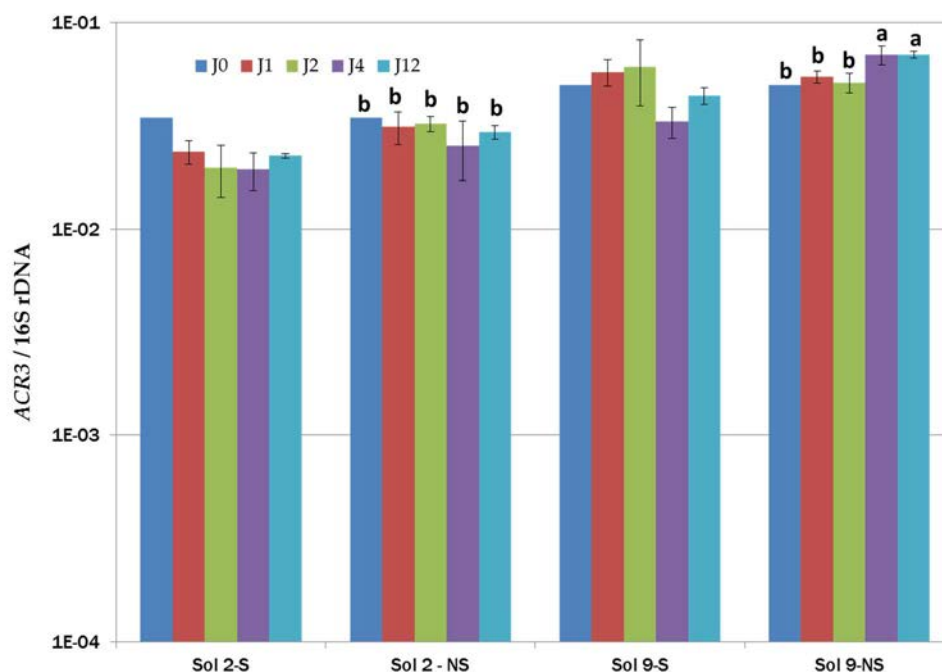
Effet du temps	p-value	0 j	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	0,221	/	/	/	/	/
Sol 2-NS		/	/	/	/	/
Sol 9-S	< 0,0001	C	C	A	A	B
Sol 9-NS (*)						
Sol 2-NS	0,132	/	/	/	/	/
Sol 9-NS		/	/	/	/	/
Sol 2-S	0,000	C	BC	A	A	B
Sol 9-S						

Figure 70 : Abondance relative du gène *arsB* dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.

Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Neuman-Keuls. (*) indique que pour ce groupe, il existe un effet de l'interaction des facteurs reporté par les lettres sur l'histogramme du dessus.

Les résultats divergent légèrement en ce qui concerne la quantification du gène *ACR3* dans les microcosmes (Figure 71). La proportion de ces bactéries est plus importante dans le sol 9 indépendamment de la source de carbone. De plus, le sol 2 stimulé présente une abondance de gènes *ACR3* significativement plus faible que dans le sol 2 non stimulé. Aucune différence n'est remarquable entre les microcosmes « Sol 9-S » et « Sol 9-NS » et le temps d'incubation

joue un rôle essentiellement dans le sol 9 non stimulé puisque l'abondance du gène *ACR3* y est significativement plus importante après 4 jours d'incubation.



Caractéristiques	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Concentration en arsenic	0,002	B		A	
	< 0,0001		B		A
Présence d'une source de carbone	0,006	B	A		
	0,131			/	/

Effet du temps	p-value	0 j	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	0,067	/	/	/	/	/
Sol 2-NS						
Sol 9-S	0,410	/	/	/	/	/
Sol 9-NS						
Sol 2-NS	0,021	B	B	B	AB	A
Sol 9-NS (*)						
Sol 2-S	0,246	/	/	/	/	/
Sol 9-S						

Figure 71 : Abondance relative du gène *ACR3* dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.

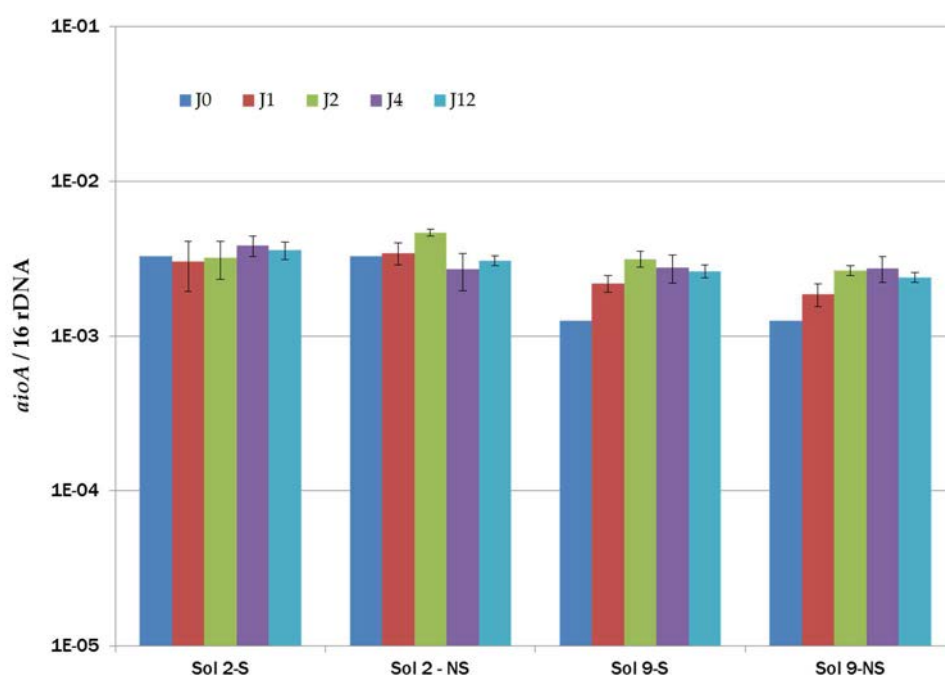
Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à deux facteurs. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Neuman-Keuls. (*) indique que pour ce groupe, il existe un effet de l'interaction des facteurs reporté par les lettres sur l'histogramme du dessus.

VI.3.2.4.2. Quantification des gènes codant l'arsénite-

oxydase

La figure 72 synthétise les résultats de la quantification du gène *aioA* au cours du temps dans l'ensemble des microcosmes :

- Dans les microcosmes stimulés, la proportion de bactéries possédant le gène *aioA* est significativement plus importante dans les microcosmes « Sol 2-S ».
- Aucun effet de la source de carbone n'est remarquable en ce qui concerne l'abondance relative de ce gène.
- Dans les microcosmes de sol 9, qu'ils soient stimulés ou non, nous observons une augmentation de l'abondance du gène *aioA* au cours du temps et cela à partir de d'un jour d'incubation.



Caractéristiques	p-value	Sol 2-S	Sol 2-NS	Sol 9-S	Sol 9-NS
Concentration en arsenic	0,002	A		B	
	0,054		/		/
Présence d'une source de carbone	0,600	/	/		
	0,187			/	/

Effet du temps	p-value	0 j	1 j	2 j	4 j	12 j
Sol 2-S	0,999	/	/	/	/	/
Sol 2-NS						
Sol 9-S	0,000	C	B	A	A	A
Sol 9-NS						
Sol 2-NS	0,965	/	/	/	/	/
Sol 9-NS						
Sol 2-S	0,173	/	/	/	/	/
Sol 9-S						

Figure 72 : Abondance relative du gène *aioA* dans les microcosmes de sols stimulés (Sol 2-S et Sol 9-S) ou non (Sol 2-NS et Sol 9-NS) par l'ajout de citrate et de nitrate au cours du temps.

Les tableaux présentent les résultats de l'ANOVA à 2 facteurs. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Neuman-Keuls.

VI.3.2.4.3. Corrélations entre l'abondance relative des gènes et l'arsenic (bio)disponible

Le tableau 27 répertorie l'ensemble des corrélations de Pearson entre l'abondance relative des gènes codant l'ARNr 16S, *arsB*, *ACR3* et *aioA* et les fractions d'arsenic et d'antimoine extractibles à l'eau et au phosphate de potassium. Ce tableau synthétise également les corrélations observées entre les différentes fractions mesurées de ces métalloïdes. Ces résultats révèlent une forte corrélation positive entre l'abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3* avec l'arsenic et l'antimoine mais aussi une forte corrélation négative entre l'abondance relative du gène *aioA* et du gène codant l'ARNr 16S et ces ETM. De plus, les fractions mobiles et échangeables au phosphate de potassium sont fortement corrélées positivement entre elles.

Abondance relative des gènes	Coefficient de corrélation de Pearson			
	As – eau	As – phosphate de potassium	Sb – eau	Sb – phosphate de potassium
ADNr 16S	- 0,786	- 0,737	- 0,771	- 0,749
<i>arsB</i>	0,419 ^{0,003}	0,423 ^{0,003}	0,457 ^{0,001}	0,429 ^{0,002}
<i>ACR3</i>	0,664	0,682	0,672	0,681
<i>aioA</i>	- 0,409 ^{0,004}	- 0,412 ^{0,004}	- 0,394 ^{0,006}	- 0,415 ^{0,003}
As – eau	1	0,927	0,976	0,940
As – phosphate de potassium	0,927	1	0,957	0,999
Sb – eau	0,976	0,957	1	0,966

Tableau 27 : Test de corrélation de Pearson entre l'abondance relative des gènes bactériens et les concentrations en arsenic et en antimoine extractibles à l'eau et échangeables au phosphate de potassium. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs dont la corrélation présente une p-value < 0,0001 et les valeurs en exposant correspondent aux p-values ≥ 0,0001.

VI.4. DISCUSSION

Le suivi de l'évolution au cours du temps de l'abondance relative des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* dans une communauté bactérienne présente dans des microcosmes de sol contenant différentes concentrations en arsenic et en antimoine totaux et (bio)disponibles est un travail original. En effet, à notre connaissance, aucune étude répondant à cette problématique n'est connue à ce jour. La démarche expérimentale développée ici était de stimuler cette communauté bactérienne soit par un fort apport en eau, soit par un apport en sources de carbone et d'azote exogènes, et par une incubation à une température de 24°C.

VI.4.1. ARSENIC ET ANTIMOINE MOBILES ET DISPONIBLES vs TENEURS TOTALES RESPECTIVES DANS LES MICROCOSMES DE SOL

Dans cette étude, nous examinons des sols présentant différents degrés de contamination à l'arsenic et à l'antimoine. De nombreuses études montrent que la concentration en ETM totaux est un faible indicateur de la concentration réelle dans la solution de sol à laquelle les microorganismes sont exposés et certains auteurs vont même jusqu'à conclure à l'absence de méthode universelle et acceptable pour évaluer la biodisponibilité des ETM dans le sol (Giller *et al.*, 1998 ; Ollivier *et al.*, 2012). En effet, à l'heure actuelle, il est difficile d'apprécier réellement de quelle manière les microorganismes ressentent les divers stress liés à des

pollutions variées dans leurs habitats naturels. Néanmoins, nos résultats laissent penser que les bactéries sont directement exposées à la fraction soluble d'arsenic et d'antimoine mais qu'elles perçoivent également les fractions échangeables de ces métalloïdes.

Dans les sols du site d'Auzon, les pourcentages en arsenic soluble et échangeable au phosphate de potassium varient en fonction des échantillons. Ces pourcentages ne sont pas corrélés à la quantité de matière organique sur laquelle les formes inorganiques de ce métalloïde auraient pu s'adsorber et ils ne sont pas non plus corrélés au pH. Cependant, d'autres facteurs sont connus pour influencer la mobilité et la disponibilité des ETM dans les sols. Par exemple l'âge de la pollution peut avoir un impact (Fendorf *et al.*, 2004, Juhasz *et al.*, 2008) ou d'autres paramètres du sol non analysés dans cette étude tels que l'effet des altérations géologiques et biologiques (ensembles des transformations minéralogiques des roches en grains sédimentaires) ou des changements de potentiel redox (Masscheleyn *et al.*, 1991, Ribet *et al.*, 1995, Oremland et Stolz, 2003). Ces facteurs coexistent toujours dans les environnements naturels et les effets géochimiques et microbiologiques ont été rarement considérés de manière simultanée (Lee *et al.*, 2010).

VI.4.2. BACTERIES PRESENTES DANS LES MICROCOSMES DE SOLS

VI.4.2.1. La communauté bactérienne totale

Certaines études suggèrent que la contamination d'un sol à l'arsenic a un impact défavorable sur les biomasses et respirations microbiennes (Edvantoro *et al.*, 2003 ; Van Zwieten *et al.*, 2003 ; Ghosh *et al.*, 2004 ; Gough *et al.*, 2008). Dans certains cas, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la pollution d'un sol aux ETM et la biomasse microbienne (Knight *et al.*, 1997). La mesure des paramètres microbiens comme la biomasse microbienne et son activité (respiration du sol et activités enzymatiques) fournissent donc des indications sensibles sur l'effet de la pollution des sols par les ETM sur les communautés microbiennes. Par contre, il est important que l'analyse porte sur un ensemble de paramètres et non pas sur un paramètre isolé (Brookes, 1995). Dans cette étude, nous avons montré que la minéralisation du carbone est plus faible dans le sol fortement contaminé par As et Sb, ce qui pourrait être attribué à une toxicité accrue du milieu due à une fraction d'arsenic disponible plus importante. Néanmoins, les communautés de ces deux sols répondent au plan métabolique et l'apport des sources de carbone et d'azote augmente considérablement la respiration de ces sols. Le sol 9 stimulé produit une quantité de CO₂ plus importante que le sol 2 non stimulé nous amenant à penser que cet ajout de citrate et de nitrate de potassium

stimule une communauté bactérienne indigène déjà adaptée à la forte présence de ces métalloïdes.

Ces résultats sont en accord avec la quantification de l'abondance relative de l'ADNr 16S puisque cette abondance est dans son ensemble plus importante dans le sol 2 et, dans le sol 9, l'ADNr 16S est plus abondante après la stimulation du sol par le citrate et le nitrate de potassium. Dans une récente étude, Sheik *et al.* (2012) ont étudié trois échantillons de sol présentant différents niveaux de contamination par l'arsenic et le chrome sur le site d'une ancienne tannerie au Pakistan. Ces auteurs ont mis en évidence, par pyroséquençage et après observations des courbes de raréfaction, un nombre inférieur d'OTUs différentes dans les sols contaminés par rapport à leurs sols témoins. En revanche, ils ont quantifié par PCR en temps réel l'abondance relative de l'ADNr 16S, qui s'est révélée être supérieure d'un ordre de grandeur dans le sol contaminé ($13,9 \mu\text{g.g}^{-1}$) que dans le sol peu contaminé ($6,6 \mu\text{g.g}^{-1}$), ce qui est cohérent avec nos résultats. Dans le cadre de notre étude, les concentrations en arsenic dans les échantillons de sol sont très nettement supérieures aux concentrations mesurées sur le site pakistanais ce qui nous amène à supposer que la sélection bactérienne a été d'autant plus forte dans nos microcosmes de sol.

En revanche, contrairement à l'expérience en microcosmes des sols 4, 6, 9 et 10 humidifiés à 80 % au cours de laquelle l'abondance relative de l'ADNr 16S avait augmenté d'environ trois ordres de grandeur, l'expérience en microcosmes des sols 2 et 9 n'a pas conduit à une production de biomasse aussi élevée. Cela pourrait être expliqué par le fait que la croissance bactérienne est beaucoup plus rapide lorsque les conditions de croissance sont riches en eau contrairement à un sol porté à 80 % de sa C.R.E.

Le comptage des UFC (Unity forming colony) sur boîte de gélose aurait permis de connaître la proportion de bactéries en vie dans ces microcosmes au temps initial et à la fin de la période d'incubation. Ainsi, nous aurions pu évaluer l'impact de l'arsenic et de l'antimoine sur les communautés bactériennes de manière plus précise.

VI.4.2.2. La communauté bactérienne résistante à l'arsenic

La quantification des bactéries possédant les gènes *arsB* et *ACR3* révèle que l'abondance relative du gène *ACR3* est plus importante que celle du gène *arsB* et cette différence est plus marquée dans le sol 9. Il semblerait donc que les bactéries les mieux adaptées pour résister à

un très fort stress à l'arsenic possèdent préférentiellement le gène *ACR3*. Cette conclusion est renforcée par une étude réalisée sur des sols contaminés à l'arsenic, montrant que les bactéries isolées contenant les gènes *ACR3* présentaient une plus forte tolérance à ce métalloïde en comparaison avec les bactéries possédant le gène *arsB* (Cai *et al.*, 2009).

Ensuite, aucune corrélation directe n'est remarquée entre l'abondance relative des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA* et les concentrations en arsenic des échantillons de sol utilisés au cours de l'incubation des sols 4, 6, 9 et 10. Au cours de l'incubation des sols 2 et 9, cependant, l'abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3* est plus importante dans le sol 9, excepté pour le gène *aioA* qui, dans les microcosmes stimulés, est plus abondant dans le sol 2. Il est difficile de discuter ces résultats car à notre connaissance, très peu d'études publiées ont abordé cette question. Les travaux de Corsini *et al.* (2011) ne comprennent pas de quantification des gènes *arsB* et *ACR3* dans leurs systèmes expérimentaux de sol immergé. Ils concluent uniquement sur la présence de bactéries possédant ces gènes et sur l'impact du citrate sur la communauté bactérienne et sur la mobilisation de l'arsenic comme nous l'avons expliqué dans le paragraphe « Contexte et objectifs » de cette partie. En ce qui concerne l'abondance du gène *aioA*, les conclusions tirées de cette étude sont similaires au phénomène observé au cours de l'expérience en milieu liquide décrite dans le chapitre II. En effet, l'abondance relative de ce gène y était également moins importante en présence de fortes concentrations en As(III).

VI.4.3. CONCENTRATIONS D'ARSENIC ET D'ANTIMOINE MOBILES ET ECHANGEABLES ET ABONDANCE RELATIVE DE L'ADNr 16S ET DES GENES *arsB*, *ACR3* et *aioA*

Lors de l'incubation des sols 4, 6, 9 et 10, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'abondance des gènes ADNr 16S, *arsB*, *ACR3* et *aioA* et les quantités d'arsenic et d'antimoine totaux présentes dans ces sols. Nous avons voulu savoir si l'abondance de ces gènes était plutôt liée aux fractions solubles et échangeables de métalloïde à plus long terme.

Nos résultats de mobilité de l'arsenic et de l'antimoine mettent en évidence un effet significatif de l'apport en citrate puisque la fraction d'arsenic extractible à l'eau est augmentée dans les microcosmes « Sol 2-S » et « Sol 9-S ». Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Corsini *et al.* (2011) qui montrent que la présence d'une source de carbone améliore l'activité bactérienne et conduit à une libération de fortes quantités d'arsenic dans la phase aqueuse. En revanche, notre étude apporte deux nouveaux éléments puisque la fraction d'arsenic échangeable au phosphate de potassium est plus importante dans les

microcosmes contenant le sol 2 non stimulé et équivalente dans les microcosmes contenant le sol 9. (i) L'apport de citrate joue donc un rôle sur la fraction mobile d'arsenic mais pas sur la fraction échangeable d'arsenic et (ii) l'influence du citrate augmente la fraction mobile d'antimoine mais uniquement dans le sol 2 moins contaminé.

L'abondance du gène ADNr 16S est corrélée négativement avec l'ensemble des fractions d'arsenic et d'antimoine et cette corrélation négative est plus importante avec les fractions de ces deux métalloïdes extractibles à l'eau. Ceci peut s'expliquer par l'effet de la contamination d'un sol sur la biomasse microbienne (§ V.3.2.1. de ce chapitre) et par le fait que la fraction extractible à l'eau de ces deux métalloïdes constituerait la fraction la plus toxique pour les bactéries. L'abondance relative du gène *aioA* est également corrélée négativement aux teneurs en métalloïdes, mais, cette fois, la corrélation est plus prononcée par rapport à la fraction échangeable. L'abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3* est corrélée positivement avec les fractions d'arsenic et d'antimoine mais, dans le cas du gène *ACR3*, cette corrélation est plus forte avec la fraction échangeable de ces deux métalloïdes.

Le réactif le plus souvent utilisé pour caractériser la fraction échangeable de l'arsenic est le carbonate de sodium (NaHCO_3) (McLaren *et al.*, 1998). En comparant l'effet de la fraction extractible à l'eau et la fraction échangeable au NaHCO_3 , Ghosh *et al.* (2004) ont avancé le fait que la fraction labile c'est-à-dire extractible à l'eau exerçait l'effet le plus inhibiteur sur l'ensemble des paramètres biologiques des sols contaminés à l'arsenic. Dans le cadre de cette étude ayant comme support des sols contenant de fortes concentrations en fer, nous n'avons pas considéré les autres paramètres biologiques mais il semble que les bactéries possédant les gènes *ACR3* et *aioA* sont plus sensibles aux fractions d'arsenic et d'antimoine échangeables au phosphate de potassium. Cette observation imprévue nous conduit à émettre l'hypothèse que ces bactéries résistantes à ces ETM pourraient aussi posséder les gènes impliqués dans la réduction du Fe(III). Il serait pertinent, dès lors, de quantifier par PCR en temps réel les gènes impliqués dans ces processus afin de savoir si l'abondance de ces gènes est corrélée à cette fraction échangeable d'arsenic et d'antimoine.

VI.4.4. (BIO)DISPONIBILITE DES ETM vs COMMUNAUTES BACTERIENNES DANS CES MICROCOSMES

VI.4.4.1. Evaluation de la (bio)disponibilité

Notre méthode d'évaluation de la biodisponibilité de l'arsenic par l'analyse de la fraction échangeable au phosphate de potassium est à discuter puisque, jusqu'à présent, aucune

étude n'a comparé des résultats obtenus par cette méthode et les données qui auraient été apportées par un test *in vivo* sur ce même sol. Seul Juhasz *et al.* (2009) ont testé quatre tests *in vitro* utilisés couramment pour appréhender la bioaccessibilité de l'arsenic dans douze échantillons de sol : PBET (Oomen *et al.*, 2003), IVG (Rodriguez et Basta, 1999), DIN (Deutsches Institut für Normung, 2000) et SBRC (Kelley *et al.*, 2002). Les résultats de ces quatre tests étaient corrélés aux valeurs de biodisponibilité *in vivo* chez le porc et le test SBRC fournissait la meilleure prédiction de la biodisponibilité relative de l'arsenic ($R^2 = 0,75$ et coeff. de corrélation de Pearson = 0,87). Nous pouvons cependant estimer que la méthode d'évaluation de la fraction échangeable au phosphate de potassium est légitime pour évaluer une des fractions disponibles de l'arsenic et aussi de l'antimoine car ces fractions sont très fortement corrélées aux fractions de ces ETM extractibles à l'eau.

VI.4.4.2. Lien(s) entre les communautés bactériennes de ces sols et la (bio)disponibilité de l'arsenic et de l'antimoine

Il est difficile, d'après ces résultats, de savoir si les bactéries résistantes à l'arsenic ont un effet sur la disponibilité de l'arsenic et de l'antimoine ou si la disponibilité de ces ETM influence l'abondance de ces bactéries ou si d'autres bactéries présentes initialement dans les communautés de ces échantillons de sol jouent un rôle sur cette disponibilité comme par exemple les bactéries Fe(III)-réductrices. Ce processus de réduction du Fe(III) est bien documenté dans la littérature et il a été montré que les bactéries telluriques pouvaient affecter la disponibilité de l'arsenic par différents moyens ; les microorganismes peuvent réduire le Fe(III) dans les minéraux, impliquant une solubilisation minérale et une libération consécutive de l'arsenic adsorbé sur ces phases minérales (Rowland *et al.*, 2009 ; Kar *et al.*, 2010 ; Reza *et al.*, 2010 ; Mumford *et al.*, 2012). Les microcosmes de cette expérience sont aérobies mais nous ne pouvons pas exclure le fait qu'à l'échelle micrométrique, il existe très probablement des zones anaérobies.

CHAPITRE IV

*DISCUSSION
GENERALE
et
PERSPECTIVES*

Le terme « **adaptation** » désigne l'ensemble des caractéristiques morphologiques et physiologiques provenant de la sélection qui permet aux organismes de se multiplier dans un biotope donné (Bertrand *et al.*, 2011). L'**adaptabilité** est la capacité à l'adaptation : la présence de certains gènes fonctionnels dans les génomes bactériens pourrait correspondre à cette dernière notion. La dynamique temporelle de l'abondance relative d'un gène fonctionnel, lorsqu'elle témoigne d'une augmentation de la proportion bactérienne possédant ce gène, est le signe que ces bactéries se sont adaptées à leurs conditions environnementales. Mais, seule la réponse transcriptionnelle de ce gène, lorsqu'elle est visualisable et quantifiable, permet de confirmer que l'adaptation au stress étudié est liée au gène d'intérêt. Cette étude avait un double objectif : (i) elle visait à étudier et à mieux comprendre un aspect de la réponse adaptative des communautés bactériennes telluriques aux milieux anthropisés, particulièrement pollués aux métaux et métalloïdes ; la réponse adaptative des micro-organismes dans son ensemble comprenant un grand nombre d'autres mécanismes moléculaires, non étudiés ici. Le développement d'outils de biomarqueurs bactériens rapides représentant un progrès dans le domaine du biocontrôle environnemental et dans la prédiction de la biodisponibilité des ETM (Bouskill *et al.*, 2007), (ii) ces travaux de thèse visaient à déterminer dans quelle mesure les abondances et expressions relatives de gènes bactériens de résistance aux métaux/métalloïdes constituent des biomarqueurs pertinents des concentrations biodisponibles en ETM dans les sols.

Nos recherches se sont focalisées sur l'effet de l'arsenic et, dans la dernière expérience, de l'antimoine sur ces communautés bactériennes, en analysant l'abondance, l'expression et la diversité des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA*. La figure 73 illustre la démarche expérimentale suivie durant ce travail de thèse, comprenant notamment une complexification progressive des matrices expérimentales. En commençant par un système expérimental simplifié tels que les enrichissements en milieu liquide et en terminant par une approche en microcosmes de sol, nous avons pu constater une certaine homogénéité des résultats et cela dans différentes conditions. Afin d'éviter une redondance, la discussion générale et les perspectives concernant la conception des amorces oligonucléotidiques ciblant les ATPases de type P_{IB} (§ II.4. du chap. « Résultats ») ne figureront pas dans ce chapitre IV.

Expression relative des gènes arsB, ACR3 et aioA

La figure 73 résume les résultats obtenus pour chacune des expériences. La première partie de cette figure met en avant l'induction de l'expression des gènes *arsB* et *ACR3* pour les enrichissements en milieu liquide à partir de 0,1 mM d'As(III) et dans les batchs en sable en présence des deux formes inorganiques de l'arsenic. Il semble donc que l'expression de ces gènes et certainement la production des pompes d'efflux de l'arsenic soient nécessaires aux populations bactériennes pour s'adapter à ces fortes concentrations arséniées. Les conclusions tirées des résultats concernant l'expression du gène *aioA* dans ces deux expériences sont divergentes puisque, dans le cas des enrichissements en milieu liquide, des bactéries affiliées au genre *Pseudomonas* semblent exprimer à un niveau basal ce gène contrairement à l'expérience en batchs dans du sable dans laquelle les ARNm *aioA* ne sont pas détectables en absence d'arsenic. De plus, dans les enrichissements en présence de la concentration en As(III) la plus élevée (10 mM), l'expression de ces gènes n'a pas été détectée malgré une oxydation significative de l'As(III) en As(V). Les processus d'oxydation de l'As(III) et donc de mobilisation de l'arsenic ne sont pas toujours corrélés avec l'expression des gènes *aioA* dans les dispositifs expérimentaux mis en place au cours de la thèse, mais aussi dans les conditions environnementales (Inskeep *et al.*, 2007). L'approche expérimentale en microcosmes à partir des communautés bactériennes indigènes du sol d'Auzon, fortement pollué en arsenic et d'autres ETM, n'a permis ni de confirmer ni d'infirmer ces conclusions. La recherche de gènes-candidats en tant que biomarqueurs spécifiques d'une pollution arséniée se poursuit donc à travers l'évolution de leur abondance au cours du temps, en fonction de la complexité de la matrice expérimentale et de la concentration en arsenic disponible dans l'environnement bactérien.

Abondance relative des gènes arsB, ACR3 et aioA

L'abondance relative des gènes *arsB* et *ACR3*, codant les pompes d'efflux de l'As(III), est fortement corrélée aux concentrations en arsenic et en antimoine présentes dans l'environnement des bactéries, que ce soit dans un milieu de culture liquide ou dans le sol provenant du site d'Auzon. Cette corrélation est plus importante pour l'abondance relative du gène *ACR3* que pour celle du gène *arsB*. Une comparaison des valeurs obtenues au long des différentes expériences révèle que l'abondance relative du gène *arsB* varie peu en présence d'arsenic, quelle que soit la matrice utilisée. En effet, elle se situe entre 10^{-3} et 10^{-2}

copies de gènes par copie d'ADNr 16S, qu'il s'agisse d'une culture liquide, du sol de Neuves-Maisons ou encore du sol fortement pollué en arsenic d'Auzon. Pour définir un biomarqueur, celui-ci doit donner une indication précise sur une éventuelle pollution et ce, quel que soit l'échantillon de sol testé. L'abondance relative du gène *ACR3*, quant à elle, suit le gradient de pollution des milieux d'étude ; cette abondance est plus importante dans le sol d'Auzon (environ 10^{-1} copies de gènes par copie d'ADNr 16S) que dans le sol de Neuves-Maisons (entre 10^{-2} et 10^{-1} copies de gènes par copie d'ADNr 16S), qui est, elle-même, plus importante que dans les expériences en milieu liquide et en sable (inférieure à 10^{-2} copies de gènes par copie d'ADNr 16S). Une partie de ces travaux, quantifiant ce gène dans des parcelles lysimétriques (figure 73, en bas et à droite), met en avant le fait que son abondance relative est plus importante dans les parcelles lysimétriques non végétalisées. Ces résultats ont été confirmés dans les microcosmes de sol d'Auzon dans lesquels les bactéries possédant le gène *ACR3* se développent préférentiellement en absence de source externe de carbone et d'azote. Ainsi dans ces microcosmes, l'abondance de ce gène est plus importante dans les microcosmes non stimulés par le citrate et le nitrate d'ammonium.

Le fait que, dans cette dernière expérience, les bactéries possédant le gène *arsB* se développent dans des conditions riches en ressources nutritives contrairement aux bactéries possédant le gène *ACR3*, laisse penser que ces gènes sont présents chez des bactéries différentes, qui possèdent majoritairement un ou l'autre de ces gènes mais pas les deux. Au-delà de la source énergétique, d'autres phénomènes courants au sein des communautés bactériennes (quorum-sensing) ne sont pas étudiés dans cette étude et sont certainement impliqués dans l'augmentation de l'abondance du gène *arsB* dans les microcosmes stimulés et à l'augmentation du gène *ACR3* dans les microcosmes non stimulés.

En revanche, les conclusions concernant le gène *aioA* sont différentes puisque l'abondance relative de ce gène est inférieure dans les conditions extrêmes de stress arsénié en comparaison avec les autres conditions. Il y a bien une corrélation entre l'abondance relative de ce gène et les teneurs en arsenic et en antimoine extractibles à l'eau et au phosphate de potassium, mais cette corrélation est négative, malgré une oxydation visible de l'As(III) en As(V). Il est certain que l'oxydation bactérienne de l'As(III) constitue une application dans la bioremédiation en transformant la forme l'As(III), plus mobile et plus toxique, en As(V), forme moins toxique qui peut être immobilisée et éliminée plus facilement

des eaux contaminés (Oremland et Stolz, 2003) mais il semble que le gène *aioA* ne soit pas un candidat approprié en tant que biomarqueur d'une pollution arsénisée dans les sols ni du processus d'oxydation.

RÉPONSES BACTÉRIENNES À L'ARSENIC (et à l'antimoine)

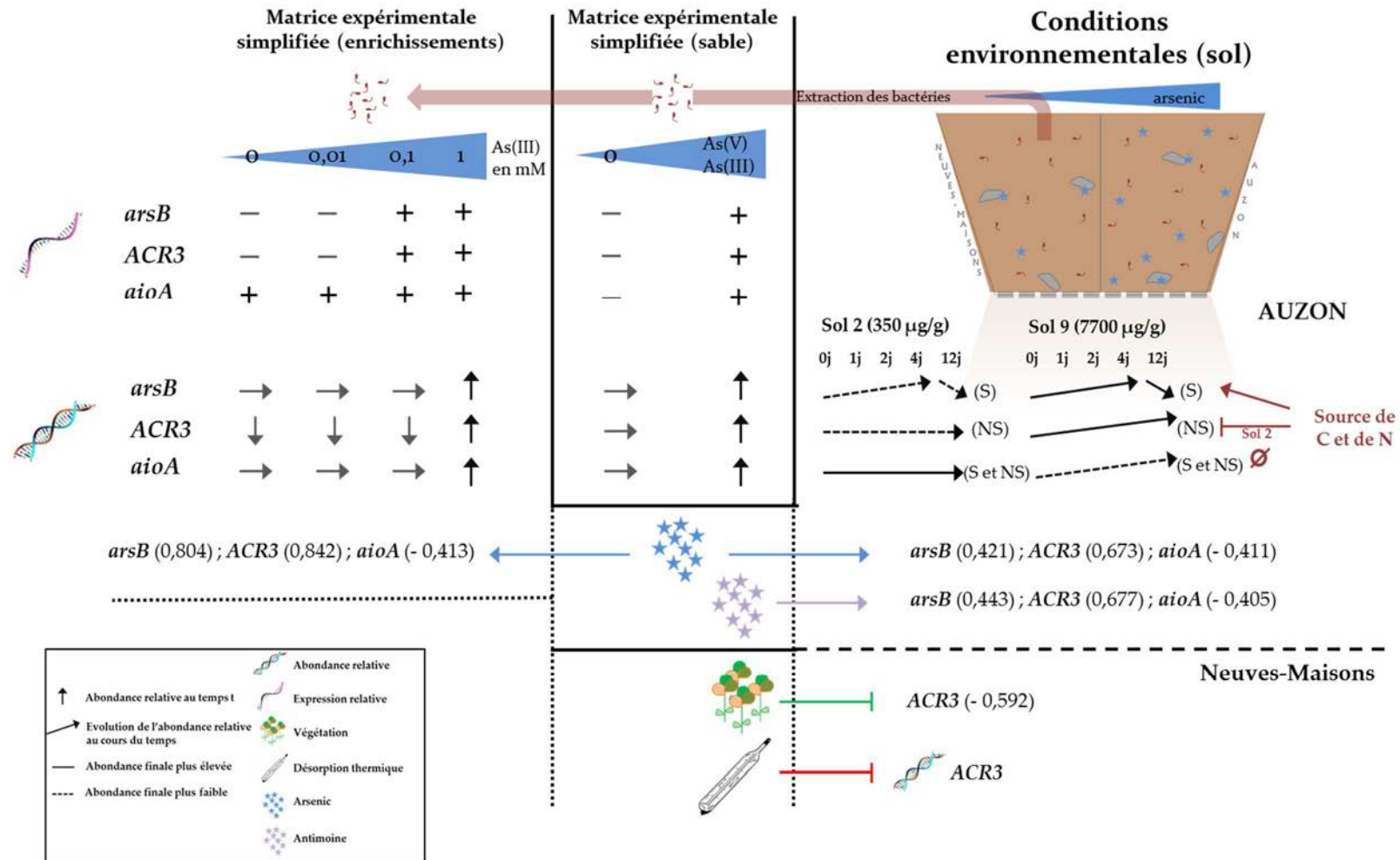


Figure 73 : Bilan de la réponse des bactéries du sol à l'arsenic et à l'antimoine à travers l'étude de l'abondance et de l'expression relatives des gènes *arsB*, *ACR3* et *aioA*

PERSPECTIVES

❖ L'abondance relative du gène *ACR3* semble répondre aux attentes que nous avons au début de ces travaux. En revanche, le nombre d'expériences est encore limité pour valider ce gène comme biomarqueur d'une pollution arsénisée. Il serait donc intéressant d'échantillonner un plus grand nombre de sols présentant différents niveaux de contamination par l'arsenic, de « réactiver » les communautés microbiennes et de quantifier l'abondance relative du biomarqueur-candidat *ACR3*. L'objectif est de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus dans le cadre de cette étude. Si, malgré la variabilité des nombreux paramètres du sol, l'abondance relative du gène *ACR3* est toujours corrélée à la pollution disponible en arsenic et en antimoine, il serait très intéressant de tenter de modéliser ce système. Ainsi, à partir d'un échantillon de sol dont l'ensemble des paramètres agronomiques sont connus (pH, carbone organique, azote total, rapport C/N etc.), la quantification de l'abondance relative du gène *ACR3* pourrait être directement liée à la concentration en arsenic disponible dans ce sol, alors inconnue.

❖ D'après ces travaux et dans la mesure où les bactéries possédant les gènes *aioA* ne résistent pas à de fortes concentrations en arsenic (Chang *et al.*, 2007), nous pouvons nous demander dans quelle mesure l'interaction avec la plante hyperaccumulatrice d'arsenic *Pteris vittata*, ayant un effet stimulateur sur l'oxydation de l'As(III) présent dans le sol en As(V) (Wang *et al.*, 2012), pourrait stimuler le développement des populations bactériennes possédant ce gène. Dans une telle expérience, il serait intéressant de quantifier l'abondance relative du gène *aioA* et de suivre les fractions d'arsenic et d'As(V) extractibles à l'eau afin de vérifier si l'interaction avec cette plante a un effet sur la résistance des communautés bactériennes impliquées dans ce processus, et si dans ce cas précis, l'oxydation peut être corrélée avec l'abondance relative du gène *aioA*. L'objectif d'une telle approche serait d'immobiliser l'arsenic dans les sols pollués afin d'empêcher son transfert vers les eaux souterraines.

Une approche biochimique pourrait compléter ces travaux sur la recherche de biomarqueurs d'une pollution arsénisée dans les sols en ce qui concerne le gène *aioA*, codant l'As(III)-oxydase. En effet, en conclusion de ce travail, il semble que ni l'abondance ni l'expression relative de ce gène ne soient des biomarqueurs appropriés des processus d'oxydation de

l'As(III). Ce résultat surprenant nous conduit à envisager des processus de régulation post-transcriptionnels (Muller *et al.*, 2007 ; Koechler *et al.*, 2010) : pour cela, la quantification des sous-unités AioA des As(III)-oxydases, par spectrométrie de masse, pourraient apporter une réponse à cette question. Plus précisément, si les gènes *aioA* sont présents et transcrits de manière basale en absence d'arsenic mais que les protéines AioA sont non détectables et que, en présence de fortes concentrations en arsenic, comme nous l'avons vu, l'abondance et l'expression relatives de ce gène sont faibles mais que les protéines AioA sont quantifiables, alors l'implication d'une régulation post-transcriptionnelle serait mise en évidence. Dans ce cas-là, non pas les gènes ni les transcrits seraient des biomarqueurs pertinents de la présence d'arsenic dans l'environnement bactérien mais bien les protéines.

❖ A la question de savoir si la diversité bactérienne renseigne sur la contamination du sol, une nouvelle perspective à ce travail serait d'étudier la diversité des bactéries possédant les gènes *arsB* et *ACR3* dans les microcosmes d'Auzon afin d'observer l'impact de la contamination en arsenic et de préciser l'impact de la source de carbone. En effet, la littérature présente des résultats divergents à ce sujet : il était admis que la contamination de l'arsenic exerçait une forte pression de sélection sur les communautés microbiennes (Cai *et al.*, 2009 ; Xiong *et al.*, 2010). Cependant, en 2012, Xiong *et al.* ont analysé des échantillons de sol provenant d'un site anciennement pollué à l'arsenic mais prélevés à différentes profondeurs. A travers cette étude, les auteurs ont montré que, malgré les concentrations en arsenic similaires pour toutes les profondeurs de sols, des changements dans la structure des bactéries résistantes à l'arsenic étaient tout de même détectés. L'hypothèse avancée ici est que les facteurs biogéochimiques sont tout aussi importants que la contamination pour façonner la communauté microbienne (Haack *et al.*, 2004) comme par exemple le carbone disponible, l'isolement spatial c'est-à-dire la zone de prélèvement (Zhou *et al.*, 2004) et globalement les caractéristiques du sol qui peuvent conduire à la différenciation de la composition microbienne (Fierer *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, il reste difficile pour les microbiologistes d'établir des liens mécanistiques entre la diversité bactérienne et le fonctionnement des écosystèmes et de comprendre les rôles de la biodiversité et des réarrangements génétiques et métaboliques dus aux ETM. Pour s'attaquer à ces challenges, les technologies basées sur les biopuces ont été développées pour

analyser les communautés microbiennes. C'est pour cette raison qu'en 2007, He *et al.* ont développé des puces de gènes fonctionnels (GeoChip 2.0). Depuis cette date, le développement rapide du séquençage à haut débit a entraîné une augmentation considérable du nombre de séquences de gènes fonctionnels. Par conséquent, les puces à ADN GeoChip doivent être continuellement mises à jour et améliorées. Ainsi, en 2010, He *et al.* ont conçu les puces GeoChip 3.0, outils essentiels pour montrer l'impact de la diversité des plantes sur la structure, la composition et les éventuelles activités fonctionnelles des communautés microbiennes. Ces puces couvrent approximativement 57000 séquences nucléotidiques dans 292 familles de gènes fonctionnels. Dans le cadre de cette étude, il serait très intéressant d'utiliser cet outil novateur afin d'expliquer l'augmentation significative de l'abondance relative du gène *ACR3* dans les parcelles NM-TN, NM-VS, NM-MSm et TD-MSm au temps T6 ainsi que l'effet négatif de la végétation sur l'abondance de ce gène. En effet, ces puces contiennent 41 gènes de résistance aux ETM dont l'arsenic, codant essentiellement des transporteurs, constituant le mécanisme le plus répandu dans les processus de résistance aux ETM chez les procaryotes. Ainsi, il serait possible de vérifier et de mettre en corrélation l'augmentation de l'abondance de ce gène avec la diminution de la biomasse pour, ensuite, tenter d'en appréhender ses causes et de cibler les gènes induits et réprimés par la présence de végétation. Il est vrai que ce changement de la communauté microbienne peut être lié à de nombreux facteurs et processus tels que les cycles biogéochimiques, les changements climatiques ou d'autres processus écologiques. Un autre intérêt de ces puces est, qu'à la différence des puces précédentes, elles incluent le marqueur phylogénétique *gyrB*. Elles permettent, dès lors, d'analyser les gènes fonctionnels et les identités phylogénétiques des communautés microbiennes et de lier ces microorganismes à leurs potentiels fonctionnels. Cependant, la plupart des outils moléculaires ciblant l'ADN donne une vue biaisée en surestimant les capacités de résistance aux ETM puisque ces outils quantifient l'ADN non seulement présent dans les populations bactériennes actives mais aussi dans les microorganismes en dormance et même morts (Pietramellara *et al.*, 2009). Ce raisonnement nous amène, à nouveau, aux études de transcriptomique, qui permettent aux gènes exprimés (ARNm) d'être récupérés et séquencés (Simon et Daniel, 2011), offrant une vision plus réaliste de la fonction écologique. Un avantage particulier de ces approches est qu'elles

fournissent une perspective moins biaisée de la diversité et de la fonction d'une communauté *in situ* (de Menezes *et al.*, 2012) mais les ARNm extraits doivent être de très bonne qualité.

❖ La question de savoir pour quelle raison l'expression de ces gènes n'a pu être quantifiée dans le sol d'Auzon persiste. Dans les 20 dernières années, de nombreuses méthodes d'extraction des ARN du sol ont été décrites (Tsai *et al.*, 1991 ; Selenska et Klingmüller, 1992 ; Moran *et al.*, 1993 ; Borneman et Triplett, 1997 ; Fleming *et al.*, 1998 ; Mendum *et al.*, 1998 ; Griffiths *et al.*, 2000 ; Hurt *et al.*, 2001 ; Sessitsch *et al.*, 2002 ; Bürgmann *et al.*, 2003 ; Persoh *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009 ; Mettel *et al.*, 2010). Cependant, jusqu'à présent, il n'existe aucune méthode d'extraction des ARN applicables à tous les types de sol donc les chercheurs ont choisi de développer des méthodes d'extraction des ARN du sol spécifiques à leurs propres projets. L'absence de méthode universelle entrave les études transcriptionnelles des gènes bactériens dans les sols.

En 2013, Monard *et al.* ont montré que le pourcentage de la fraction sableuse dans un sol était positivement corrélée au rendement de l'extraction des ARN tandis que la quantité d'argile diminue ce rendement. Les auteurs expliquent cet impact significatif par le fait que le sable a un effet mécanique au moment de l'étape de la lyse des cellules de la même manière que les billes de verre ou la terre de diatomée. Ces observations montrent que les protocoles d'extraction des ARN ne peuvent pas être applicables à tous les types de sol. La problématique de l'extraction d'ARN des sols contaminés comme ceux de Neuves-Maisons et d'Auzon reste un verrou important à lever. D'autres méthodes devront, par conséquent, être testées afin de parvenir à étudier l'expression des gènes impliqués dans les processus de résistance à l'arsenic et à l'antimoine, ETM largement présents sur ce site. Dans ce but, une piste pourra être explorée : récemment, l'extraction des ARN du sol a été appliquée aux techniques par puces (McGrath *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011) et au séquençage à haut débit (Leininger *et al.*, 2006). Ces méthodes sont plus puissantes que la méthode de RT-PCR et peuvent fournir des informations sur l'expression globale des gènes chez les bactéries du sol (Wang *et al.*, 2012). Les protocoles ainsi mis en place, requièrent une étape de destruction des ARNr. Cette étape est primordiale afin de conserver presque uniquement les ARNm afin de permettre à l'enzyme de rétro-transcrire essentiellement les ARNm et d'obtenir un meilleur rendement d'ADNc correspondant à des gènes fonctionnels. En effet, lorsque cette étape est omise, il a été montré que le seuil de détection est plus difficilement atteignable au moment

de l'étape de quantification (de Menezes *et al.*, 2012). Dans le cadre de cette étude, les ARNr n'ont pas été éliminés des extraits d'ARN totaux et nous ne sommes pas parvenus à quantifier l'expression relative des gènes d'intérêt à partir des échantillons de sol. Les quantités et qualités insuffisantes de nos ARN ont été confirmées par spectrophotométrie au NanoDrop. Par conséquent, une fois l'obtention d'un protocole efficace sur ce type de sol, nous pouvons envisager mener à nouveau des extractions d'ARN totaux suivies d'un traitement par le kit MICROBExpress (Ambion) afin de sélectionner les ARNm présent dans les microcosmes de sol d'Auzon. Cette perspective est stimulante puisque les résultats d'expression relative pourraient appuyer le fait que le gène *ACR3* constitue un biomarqueur pertinent de la fraction disponible ou tout du moins extractible en arsenic.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdullah MI, Shiyu Z and Mosgren K** (1995) - Arsenic and selenium species in the oxic and anoxic waters of the Oslofjord, Norway *Marine Pollution Bulletin*, 31 (1-3):116-126.
- Achouak, W, Sutra L, Heulin T, Meyer JM, Fromin N, Degraeve S, Christen R, Gardan L** (2000) - *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1):9-18.
- Achour AR, Bauda P and Billard P** (2007) - Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in Microbiology*, 158(2):128-137.
- Achour-Rokbani A, Cordi A, Poupin P, Bauda P and Billard P** (2010) - Characterization of the *ars* gene cluster from extremely arsenic-resistant *Microbacterium* sp. strain A33. *Applied Environmental Microbiology*, 76(3):948-955.
- Aharoni C, Sparks DL** (1991) - Kinetics of soil chemical reactions – a theoretical treatment. In: Sparks, D.L., Suarez, D.L. (Eds.), Rates of Soil Chemical Processes. SSSA, Madison, WI, pp. 1-19.
- Ahmann D, Roberts AL, Krumholz LR, Morel FMM** (1994) - Microbe Grows by Reducing Arsenic. *Nature*, 371(6500):750-750.
- Alam MG, Tokunaga S, Maekawa T** (2001) - Extraction of arsenic in a synthetic arsenic-contaminated soil using phosphate. *Chemosphere*, 43(8):1035-1041.
- Andrewes P, Kitchin KT, Wallace K** (2003) - Dimethylarsine and trimethylarsine are potent genotoxins in vitro. *Chemical Research in Toxicology*, 16(8):994-1003.
- Arguello JM** (2003) - Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *Journal of Membrane Biology*, 195(2):93-108.
- Arguello JM, Eren E, Gonzalez-Guerrero M** (2007) - The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biomaterials*, 20(3-4):233-248.
- Axelsen KB, Palmgren MG.** (1998) - Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Evolution*, 46:84-101.

B

- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, and Mori H** (2006) - Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2:2006 0008.
- Bachate SP, Cavalca L, Andreoni V** (2009) - Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1):145-156.
- Baelum J, Nicolaisen MH, Holben WE, Strobel BW, Sorensen J, Jacobsen CS** (2008) - Direct analysis of *tfdA* gene expression by indigenous bacteria in phenoxy acid amended agricultural soil. *Isme Journal*, 2(6):677-687.
- Baize D.** (1997) - Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégies d'interprétation. INRA Éditions, Paris, 410 p.

- Beard SJ, Hashim R, MembrilloHernandez J, Hughes MN, Poole RK** (1997) - Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12 - evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Molecular Microbiology*, 25(5):883-891.
- Beckett P. H. T** (1989) - The use of extractants in studies on trace metals in soils, sewage sludges and sludge treated soils. *Advances in Soil Science*, 9:143-176.
- Bentley R, Chasteen TG** (2002) - Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2):250
- Bertrand JC, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P** (2011) - Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés: Publications de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Biache C, Mansuy-Huault L, Faure P, Munier-Lamy C, Leyval C** (2008) - Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: Impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environmental Pollution*, 156(3):671-677.
- Blondeau A.** (1992) - Histoire des laboratoires pharmaceutiques en France et de leurs médicaments, Cai L, Liu GH, Rensing C, Wang GJ : Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*, 9.
- Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, Goffeau A, Ulaszewski S** (1997) - Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(9):819-828.
- Boisson J, Mench M, Vangronsveld J, Ruttens A, Kopponen P, De Koe T** (1999) - Immobilization of trace metals and arsenic by different soil additives: Evaluation by means of chemical extractions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30(3-4):365-387.
- Borneman J, Triplett EW** (1997) - Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:1621-1624.
- Borremans B, Hobman JL, Provoost A, Brown NL, van Der Lelie D** (2001) - Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology*, 183(19):5651-5658.
- Bourelle P-H, Berthelin J** (1998) - Rapport de l'académie des sciences n°42, Ed Tc and Doc
- Bouskill NJ, Barnhart EP, Galloway TS, Handy RD, Ford TE** (2007) - Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* *sodA*, *htpX* and *mt* gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential *in situ* biomarker of environmental health. *FEMS Microbiology, Ecol.* 60, 276-286.
- Branco R, Chung AP, Morais PV** (2008) -Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. *BMC Microbiology*, 8:95.
- Brandstetter A, Lombi E, Wenzel WW, Adriano DC** (2000) - Arsenic-contaminated soils - I. Risk assessment, chap 33, in *Remediation engineering of contaminated soils*, DL Wise, DJ Trantolo, EJ Cichon, HI Inyang and U Stottmeister editors, Dekker, New York, p. 715-738.
- Brookes PC** (1995) - The Use of Microbial Parameters in Monitoring Soil Pollution by Heavy-Metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19(4):269-279.
- Bruhn DF, Li JX, Silver S, Roberto F, Rosen BP** (1996) - The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. *Fems Microbiology Letters*, 139(2-3):149-153.

Bürgmann H, Widmer F, Sigler WV, Zeyer J (2003) - mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Applied Environmental Microbiology*, 69:1928-35.

Byrne AR, Slejkovec Z, Stijve T, Fay L, Gossler W, Gailer J, Irgolic KJ (1995) - Arsenobetaine and Other Arsenic Species in Mushrooms. *Applied Organometallic Chemistry*, 9(4):305-313.

C

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

Cai L, Liu GH, Rensing C, Wang GJ (2009) - Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*, 9(4)

(b) Cai L, Rensing C, Li X, Wang, G (2009). Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp TS44. *Applied Microbiology Biotechnology*, 83:715–725.

Carlin A, Shi WP, Dey S, Rosen BP (1995) - The *Ars* Operon of *Escherichia-Coli* Confers Arsenical and Antimonial Resistance. *Journal of Bacteriology*, 177(4):981-986.

Cavalca L, Zanchi R, Corsini A, Colombo M, Romagnoli C, Canzi E, Andreoni V (2010) - Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(3):154-164.

Cebon A, Norini MP, Beguiristain T, Leyval C (2008) - Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (*PAH-RHDα*) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73(2):148-159.

Cebon A, Beguiristain T, Faure P, Norini MP, Masfaraud JF, Leyval C (2009) - Influence of Vegetation on the *In Situ* Bacterial Community and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degraders in Aged PAH-Contaminated or Thermal-Desorption-Treated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19):6322-6330.

Cebon A, Cortet J, Criquet S, Biaz A, Calvert V, Caupert C, Pernin C, Leyval C (2011) - Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research in Microbiology*, 162(9):896-907.

Challenger F (1951) - Biological methylation. *Advances in Enzymology*, 12:429-491

Challenger F (1955) - Biological methylation. *Quarterly Reviews Chemical Society* (London), 9:255-286

Challenger F (1945) - Biological methylation. *Chemical Reviews*, 36:315-361

Chan H, Babayan V, Blyumin E, Gandhi C, Hak K, Harake D, Kumar K, Lee P, Li TT, Liu HY et al. (2010) - The P-Type ATPase Superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(1-2):5-104.

Chang JS, Yoon IH, Kim KW (2007) - Isolation and *ars* detoxification of arsenite-oxidizing bacteria from abandoned arsenic-contaminated mines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(5):812-821.

Chen, CM, Misra, TK, Silver, S, and Rosen, BP (1986) - Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Journal of Biological Chemistry*, 261:15030–15038.

Chen BD, Xiao XY, Zhu YG, Smith FA, Xie ZM, Smith SE (2007) - The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. *Science of the Total Environment*, 379(2-3):226-234.

Chen XW, Li H, Chan WF, Wu C, Wu FY, Wu SC, Wong MH (2012) - Arsenite transporters expression in rice (*Oryza sativa* L.) associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization under different levels of arsenite stress. *Chemosphere*, 89(10):1248-1254.

Clingenpeel SR, D'Imperio S, Oduro H, Druschel GK, McDermott TR (2009) - Cloning and in situ expression studies of the *Hydrogenobaculum* arsenite oxidase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10):3362-3365.

Coombs JM, Barkay T (2004) - Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3):1698-1707.

Corsini A, Cavalca L, Crippa L, Zaccheo P, Andreoni V (2010) - Impact of glucose on microbial community of a soil containing pyrite cinders : Role of bacteria in arsenic mobilization under submerged condition. *Soil Biology & Biochemistry*, 42(5):699-707.

Corsini A, Cavalca L, Zaccheo P, Crippa L, Andreoni V (2011) - Influence of microorganisms on arsenic mobilization and speciation in a submerged contaminated soil: Effects of citrate. *Applied Soil Ecology*, 49:99-106.

Courtois S, Frostegard A, Goransson P, Depret G, Jeannin P, Simonet P (2001) - Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*, 3:431-9.

Cullen, WR Reimer, KJ (1989) - Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89, 713–764. Deutsches Institut für Normung Soil quality: Absorption availability of organic and inorganic pollutants from contaminated soil material; Standard DIN E 19738; e.V.:Berlin, 2000.

D

Daby, D (2006) - Coastal pollution and potential biomonitors of metals in Mauritius. *Water, Air and Soil pollution*, 174:63-91.

Daunert S, Barrett G, Feliciano J.S, Shetty R.S, Shrestha S, Smith-Spencer W (2000) – Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 7:2705-2738.

Davis CC, Knocke WR, Edwards M (2001) - Implications of aqueous silica sorption to iron hydroxide: Mobilization of iron colloids and interference with sorption of arsenate and humic substances. *Environmental Science & Technology*, 35(15):3158-3162.

Davis KER, Joseph SJ, Jannssen OH (2005) - Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:826–834.

D'Adamo R, Di Stasio M, Fabbrochini A (2008) - Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environmental monitoring and assessment*, 143:15-24.

Delbes C, Moletta R, Godon JJ (2001) - Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem. *Fems Microbiology Ecology*, 35(1):19-26.

de Menezes A, Clipson N, Doyle E (2012) - Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environmental Microbiology*, 14(9):2577-2588.

Deneux-Mustin S, Roussel-Debet S, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Colle C, Berthelin J, Garnier-Laplace J, Leyval C (2003) - Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. TEC & DOC, Paris.

Dhar RK, Zheng Y, Saltikov CW, Radloff KA, Mailloux BJ, Ahmed KM, van Geen A (2011) - Microbes Enhance Mobility of Arsenic in Pleistocene Aquifer Sand from Bangladesh. *Environmental Science & Technology*, 45(7):2648-2654.

Diaz-Bone RA, Van de Wiele TR (2009) - Biovolatilization of Metal(loid)s by Intestinal Microorganisms in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Environmental Science & Technology* 43(14):5249-5256.

Diorio C, Cai J, Marmor J, Shinder R, Dubow MS (1995) - An *Escherichia coli* Chromosomal *Ars* Operon Homolog Is Functional in Arsenic Detoxification and Is Conserved in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 177(8):2050-2056.

Dopp E, von Recklinghausen U et al. (2011) - Toxicity of volatile methylated species of bismuth, arsenic, tin, and mercury in Mammalian cells *in vitro*. *Journal of Toxicology*, 503576.

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

E

Eagon RG, Cho HW (1965) – Major products of glucose dissimilation by *Pseudomonas natriegens*. *Journal of Bacteriology*, 89(5):1209-1211

Echevarria G, Klein S, Fardeau JC, Morel JL (1996) - Mesure de la fraction assimilable des éléments en traces du sol par la méthode des cinétiques d'échange isotopique : cas du nickel. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 324:221-227

Edvantoro BB, Naidu R, Megharaj M, Singleton I (2003) - Changes in microbial properties associated with long-term arsenic and DDT contaminated soils at disused cattle dip sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3):344-351.

Elad T, Lee JH, Belkin S, Gu MB (2008) – Microbial whole-cell arrays. *Microbial Biotechnology*, 137-148.

England LS, Trevors JT, Holmes SB (2001) - Extraction and detection of baculoviral DNA from lake water, detritus and forest litter. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4):630-636.

England LS, Trevors JT (2003) - The microbial DNA cycle in soil. *Rivista di Biologia*, 96(2):317-326.

F

Farrance I (1987) - Plasma Glucose Methods, A Review. *Clinical Biochemist Reviews*, 8:55-68.

Felske A, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Quantification of 16 S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:4581–4587.

- Fendorf S, La Force MJ, Li GC** (2004) - Temporal changes in soil partitioning and bioaccessibility of arsenic, chromium, and lead. *Journal of Environmental Quality*, 33(6):2049-2055.
- Fierer N, Strichland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC** (2009) - Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters*, 12:1238–1249.
- Fitz WJ, Wenzel WW** (2002) - Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system fundamentals and potential application to phytoremediation. *Journal of Biotechnology*, 99(3):259-278.
- Fleming JT, Yao WH, Sayler GS** (1998) - Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3698–3706.
- Fränzle O** (2003) - Bioindicators and environmental stress assessment. Bioindicators and biomonitors: principles, concepts and applications, B.A. Market, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors (Amsterdam: Elsevier Science Ltd.), pp. 41-84.
- Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW, Coleman ML, Schuster SC, Chisholm SW, Delong EF** (2008) - Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10):3805-3810.
- Freitag TE, Prosser JI** (2009) - Correlation of Methane Production and Functional Gene Transcriptional Activity in a Peat Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21):6679-6687.

G

- Garbarino JR, Bednar AJ, Rutherford DW, Beyer RS, Wershaw RL** (2003) - Environmental fate of roxarsone in poultry litter. I. Degradation of roxarsone during composting. *Environmental Science & Technology*, 37(8):1509-1514.
- Gault AG, Islam FS, Poly DA, Charnock JM, Boothman C, Chatterjee D, Lloyd JR** (2005) - Microcosm depth profiles of arsenic release in a shallow aquifer, West Bengal. *Mineralogical Magazine*, 69:855–863.
- George CM, Zheng Y, Graziano JH, Bin Rasul S, Hossain Z, Mey JL, van Geen A** (2012) - Evaluation of an Arsenic Test Kit for Rapid Well Screening in Bangladesh. *Environmental Science & Technology*, 46(20):11213-11219.
- Ghosh AK, Bhattacharyya P, Pal R** (2004) - Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environment International*, 30(4):491-499.
- Giller KE, Witter E, McGrath SP** (1998) - Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11):1389-1414.
- Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J, Morel JL** (2005) - Sols et environnement. Editions Dunod, Paris, 816 p.
- Gladysheva TB, Oden KL, Rosen BP** (1994) - Properties of the Arsenate Reductase of Plasmid R773. *Biochemistry*, 33(23):7288-7293.
- Goh KH, Lim TT** (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(6):849-859.
- Gonzalez-Chavez C, Harris PJ, Dodd J, Meharg AA** (2002) - Arbuscular mycorrhizal fungi confer enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. *New Phytologist*, 155(1):163-171.

Gough HL, Dahl AL, Nolan MA, Gaillard JF, Stahl DA (2008) - Metal impacts on microbial biomass in the anoxic sediments of a contaminated lake. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 113(G2).

Grafe M, Eick MJ, Grossl PR, Saunders A (2002) - Adsorption of arsenate and arsenite on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. *Journal of Environmental Quality*, 31(4):1115-1123.

Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, Dobson G (1999) Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology & Biochemistry*, 31:145-153.

Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000) - Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:5488-5491.

H

Haack SK, Fogarty LR, Weat TG, Alm EW, McGuire JT, et al. (2004) - Forney Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. *Environmental Microbiology*, 6: 438-448

Hamamura N, Macur RE, Korf S, Ackerman G, Taylor WP, Kozubal M, Reysenbach AL, Inskeep WP (2009) - Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environmental Microbiology*, 11(2):421-431.

Hammel W, Debus R, Steubing L (2000) - Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere*, 41(11): 1791-1798.

Han JI, Semrau JD (2004) - Quantification of gene expression in methanotrophs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Environmental Microbiology*, 6(4):388-399.

He ZL, Gentry TJ, Schadt CW, Wu LY, Liebich J, Chong SC, Huang ZJ, Wu WM, Gu BH, Jardine P et al. (2007) - GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *Isme Journal*, 1(1):67-77.

He ZL, Deng Y, Van Nostrand JD, Tu QC, Xu MY, Hemme CL, Li XY, Wu LY, Gentry TJ, Yin YF et al. (2010) - GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *Isme Journal*, 4(9):1167-1179.

Henderson SL, Dandie CE, Patten CL, Zebarth BJ, Burton DL, Trevors JT, Goyer C (2010) - Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions, and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7):2155-2164.

Hery M, Dongen BEV, Gill F, Mondal D, Vaughan DJ, Pancost RD, Polya DA, Lloyd JR (2010) - Arsenic release and attenuation in low organic carbon aquifer sediments from West Bengal. *Geobiology*, 8:155-168.

Hirano S, Kobayashi Y, Cui X, Kanno S, Hayakawa T, Shraim A (2004) - The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198(3):458-467.

Hoeft SE, Blum JS, Stolz JF, Tabita FR, Witte B, King GM, Santini JM, Oremland RS (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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:504-512.

Hoeft SE, Kulp TR, Han S, Lanoil B, Oremland RS (2010) - Coupled Arsenotrophy in a Hot Spring Photosynthetic Biofilm at Mono Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14):4633-4639.

Hurt RA, Qiu X, Wu L, Roh Y, Palumbo AV, Tiedje JM, Zhou J (2001) - Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10):4495-4503.

I

Ilina Y, Sloma E, Maciaszczyk-Dziubinska E, Novotny M, Thorsen M, Wysocki R, Tamas MJ (2008) - Characterization of the DNA-binding motif of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p. *Biochemical Journal*, 415(3):467-475.

Indriolo E, Na G, Ellis D, Salt DE, Banks JA (2010) - A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell*, 22(6):2045-2057.

Inskeep WP, McDermott TR, Fendorf S (2002) - Arsenic (V)/(III) cycling in soils and natural waters - chemical and microbiological processes. In *Environmental Chemistry of Arsenic*. Frankenberger, W.T., Jr (ed.). New York, USA: Marcel Dekker, pp. 183-215.

Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, Warelou TP, Ward SA, Santini JM (2007) - Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environmental Microbiology*, 9(4):934-943.

Islam FS, Gault AG, Boothman C, Polya DA, Charnock JM, Chatterjee D, Lloyd JR (2004) - Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature*, 430:68-71.

J

Jacobsen CS, Holben WE (2007) - Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2):315-321.

Jain S, Saluja B, Gupta A, Marla SS, Goel R (2011) -Validation of Arsenic Resistance in *Bacillus cereus* Strain AG27 by Comparative Protein Modeling of arsC Gene Product. *Protein Journal*, 30(2):91-101.

Ji GY, Garber EAE, Armes LG, Chen CM, Fuchs JA, Silver S (1994) - Arsenate Reductase of *Staphylococcus aureus* Plasmid Pi258. *Biochemistry*, 33(23):7294-7299.

Jones SE, Lennon JT (2010) - Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13):5881-5886.

Jouanneau S, Durand MJ, Thouand G (2012) - Online Detection of Metals in Environmental Samples: Comparing Two Concepts of Bioluminescent Bacterial Biosensors. *Environmental Science & Technology*, 46(21):11979-11987.

Juhasz AL, Smith E, Weber J, Naidu R, Rees M, Rofe A, Kuchel T, Sansom L (2008) - Effect of soil ageing on *in vivo* arsenic bioavailability in two dissimilar soils. *Chemosphere*, 71(11):2180-2186.

Juhasz AL, Weber J, Smith E, Naidu R, Rees M, Rofe A, Kuchel T, Sansom L (2009) -Assessment of Four Commonly Employed *in vitro* Arsenic Bioaccessibility Assays for Predicting *in vivo* Relative Arsenic Bioavailability in Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*, 43(24):9487-9494.

Juste C, Chassin P, Gomez A, Linères M, Mocquot B (1995) - Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. *ADEME Editions* (Paris), 209 p.

Juste C, Solda P (1988) - Influence de l'addition de différentes matières fertilisantes sur la disponibilité du cadmium, du manganèse, du nickel et du zinc contenus dans un sol sableux amendé par des boues de station d'épuration, *Agronomie*, 8:897 – 904.

K

Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) -Trace elements in Soils and Plants, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA

Kahn D, David M, Domergue O, Daveran ML, Ghai J, Hirsch PR, Batut J (1989) – *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology*, 171(2):929-939.

Kaiser J (2001) - Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment (Enfield: Sciences publishers inc.).

Kar S, Maity JP, Jean JS, Liu CC, Nath B, Yang HJ, Bundschuh J (2010) - Arsenic-enriched aquifers : Occurrences and mobilization of arsenic in groundwater of Ganges Delta Plain, Barasat, West Bengal, India. *Applied Geochemistry*, 25(12):1805-1814.

Kashyap DR, Botero LM, Franck WL, Hassett DJ, McDermott TR (2006) - Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 188(3):1081-1088.

Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV (2002) - Assessing Oral Bioavailability of Metals in Soil; Battelle Press: Columbus, OH.

Key PB, Wirth EF, Fulton MH (2006) - A review of grass shrimp, *Palaemonetes* sp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environmental Bioindicators* 1:115-128.

Khan AA, Kim SJ, Paine DD, Cerniglia CE (2002) - Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:1997-2002.

King JMH, DiGrazia PM, Applegate B, Burlage R, Sanseverino J, Dunbar P, Larimer F, Sayler G.S (1990) – Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*, 4970:778-781.

Knight BP, McGrath SP, Chaudri AM (1997) - Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1):39-43.

Koechler S, Cleiss-Arnold J, Proux C, Sismeiro O, Dillies MA, Goulhen-Chollet F, Hommais F, Lievremont D, Arsene-Ploetze F, Coppee JY *et al.* (2010) - Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *BMC Microbiology*, 10:53.

Kozdroj J, van Elsas JD (2000) - Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry*, 32(10):1405-1417

Krafft K, and Macy JM (1998) - Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *European Journal of Biochemistry*, 255:647-653.

Kuehnelt D, Goessler W, Irgolic KJ (1997) - Arsenic compounds in terrestrial organisms .2. Arsenocholine in the mushroom *Amanita muscaria*. *Applied Organometallic Chemistry*, 11(6):459-470.

- Laffite P** (1985) – Rapport d'étude sur la contamination des sols autour du dépôt de produits chimiques d'Auzon. Référence ANRED PL/MFB/2705, 14 p.
- Laffite P** (1986) – Dépôt de produits chimiques d'Auzon, détermination du volume des terrains contaminés. Référence ANRED PL/TC/2162, 3 p.
- Lane DJ** (1991) - 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E and Goodfellow M, eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Laperche V, Eisenlohr L** (2001) – Echantillonnage d'un site contaminé par l'arsenic – Comparaison de différentes stratégies et représentativité de l'échantillonnage des sols. Rapport CNRSSP 01/11, 33p.
- Lebourg A, Proix N, Ciesielski H, Sterckeman T** (1994) - Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie* 16:201-215.
- Lee KY, Kim KW, Kim SO** (2010) - Geochemical and microbial effects on the mobilization of arsenic in mine tailing soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 32(1):31-44.
- Leedjarv A, Ivask A, Virta M** (2008) - Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 190(8):2680-2689.
- Legatzki A, Grass G, Anton A, Rensing C, Nies DH** (2003) - Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, 185(15):4354-4361.
- Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JL, Schuster SC, Schleper C** (2006) - Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104):806-809.
- Lessie TG, Phibbs PV** (1984) - Alternative Pathways of Carbohydrate Utilization in *Pseudomonas*. *Annual Review of Microbiology*, 38:359-88
- Lett MC, Muller D, Lievreumont D, Silver S, Santini J** (2011) - Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *Journal of Bacteriology*, 194: 207–208.
- Leung HM, Ye ZH, Wong MH** (2006) - Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 139(1):1-8.
- Leung HM, Ye ZH, Wong MH** (2007) - Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere*, 66(5):905-915.
- Liao VHC, Chu YJ, Su YC, Hsiao SY, Wei CC, Liu CW, Liao CM, Shen WC, Chang FJ** (2011) - Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*, 123(1-2):20-29.
- Lieutaud A, van Lis R, Duval S, Capowiez L, Muller D, Lebrun R, Lignon S, Fardeau ML, Lett MC, Nitschke W, Schoepp-Cothenet B** (2010) - Arsenite oxidase from *Ralstonia* sp. 22: characterization of the enzyme and its interaction with soluble cytochromes. *Journal of Biological Chemistry*, 285:20433–20441.
- Lin S, Del Razo LM, Styblo M, Wang, C, Cullen WR, Thomas DJ** (2001) - Arsenicals inhibit thioredoxin reductase in cultured rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 305–311.

Lin YF, Walmsley AR, Rosen BP (2006) - An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42):15617-15622.

Lynch JM (1991) - Developments in rhizosphere microbiology. *Australian Microbiologist*, 13:99-100.

Liu Y, Zhu YG, Chen BD, Christie P, Li XL (2005) - Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Mycorrhiza*, 15(3):187-192.

Liu GL, Cai Y (2010) - Complexation of arsenite with dissolved organic matter Conditional distribution coefficients and apparent stability constants. *Chemosphere*, 81(7):890-896.

Liu GL, Fernandez A, Cai Y (2011) - Complexation of Arsenite with Humic Acid in the Presence of Ferric Iron. *Environmental Science & Technology*, 45(8):3210-3216.

López-Maury L, Florencio FJ, Reyes JC (2003) - Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 185:5363–5371.

M

Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Sloma E, Migocka M, Wysocki R (2010) - The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(11):2170-2175.

Macur RE, Wheeler JT, McDermott TR, Inskeep WP (2001) - Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environmental Science & Technology*, 35(18): 3676-3682.

Madrid F, Biasioli M, Ajmone-Marsan F (2008) - Availability and bioaccessibility of metals in fine particles of some urban soils. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, 55:21–32.

Maitani T, Saito N, Abe M, Uchiyama S, Saito Y (1987) - Chemical form-dependent induction of hepatic zinc-thionein by arsenic administration and effect of co-administered selenium in mice. *Toxicology Letters*, 39:63–70.

Malasarn D, Saltikov CW, Campbell KM, Santini JM, Hering JG, Newman DK (2004) - *arrA* is a reliable marker for Ars(V) respiration. *Science*, 306: 455.

Malik A (2004) - Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30(2):261-278.

Mandal BK, Suzuki KT (2002) - Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1):201-235.

Mansour NM, Sawhney M, Tamang DG, Vogl C, Saier MH, Jr (2007) - The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *Febs J*, 274(3): 612-629.

Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (2003) - Definitions, Strategies, and Principles for Bioindication/Biomonitoring of the Environment. Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG, (eds.) Elsevier, Oxford. pp. 3-39.

Martinez R.J., Wang Y., Raimondo M.A., Coombs J.M., Barkay T., Sobecky A (2006) - Horizontal gene transfer of P_{1B}-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5):3111-3118

- Masscheleyn PH, Delaune RD, Patrick WH** (1991) - Effect of Redox Potential and pH on Arsenic Speciation and Solubility in a Contaminated Soil. *Environmental Science & Technology*, 25(8): 1414-1419.
- Matera V** (1998) – Etude de la mobilité et de la spéciation de l'arsenic dans les sols de sites industriels pollués : caractérisation des échantillons et détermination des phases porteuses. CNRSSP/98/38.
- Matera V** (2001) – Etude de la mobilité et de la spéciation de l'arsenic dans les sols de sites industriels pollués : estimation du risque induit. Thèse de l'université de Pau et des pays de l'Adour. 222 p.
- Matschullat J** (2000) - Arsenic in the geosphere - a review. *Science of the Total Environment*, 249(1-3):297-312.
- McCarren J, Becker JW, Repeta DJ, Shi YM, Young CR, Malmstrom RR, Chisholm SW, DeLong EF** (2010) - Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(38):16420-16427.
- McDonald IR, Murrell JC** (1997) - The methanol dehydrogenase structural gene *mxoF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8):3218-3224.
- McGrath KC, Mondav R, Sintrajaya R, Slattery B, Schmidt S, Schenk PM** (2010) - Development of an environmental functional gene microarray for soil microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:7161–7170.
- McLaren RG, Naidu R, Smith J, Tiller KG** (1998) - Fractionation and distribution of arsenic in soils contaminated by cattle dip. *Journal of Environmental Quality*, 27(2): 348-354.
- Mench M., Coussin F., Mocquot B., Bussière S., Prunet T., Lagriffoul A.** (1996) Evaluation des apports d'un biotest végétal et de la spéciation des éléments traces à la mise au point d'une batterie de tests d'écotoxicologie terrestre applicable aux sols et aux déchets. Rapport final, sous-thème Biotest végétal, convention 4 93 0029 Ademe, Paris.
- Mendum TA, Sockett RE, Hirsch PR** (1998) - The detection of Gram-negative bacterial mRNA from soil by RT-PCR. *Fems Microbiology Letters*, 164(2):369-373.
- Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, and Van Gijsegem F** (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 162:328-34.
- Mettel C, Kim Y, Shrestha PM, Liesack W** (2010) - Extraction of mRNA from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:5995–6000.
- Mingot J, De Miguel E, Chacon E** (2011) - Assessment of oral bioaccessibility of arsenic in playground soil in Madrid (Spain): A three-method comparison and implications for risk assessment. *Chemosphere*, 84(10):1386-1391.
- Mobley HL, Chen CM, Silver S, and Rosen BP** (1983) - Cloning and expression of R-factor mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genetics*, 191:421-6.
- Moller JV, Juul B, leMaire M** (1996) - Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, 1286(1):1-51.
- Monard C, Martin-Laurent F, Devers-Lamrani M, Lima O, Vandenkoornhuyse P, Binet F** (2010) - *atz* gene expressions during atrazine degradation in the soil drilosphere. *Molecular Ecology*, 19(4):749-759.
- Monard C, Vandenkoornhuyse P, Le Bot B, Binet F** (2011) - Relationship between bacterial diversity and function under biotic control : the soil pesticide degraders as a case study. *Isme Journal*, 5(6):1048-1056.

Monard C, Martin-Laurent F, Lima O, Devers-Lamrani M, Binet F (2013) - Estimating the biodegradation of pesticide in soils by monitoring pesticide-degrading gene expression. *Biodegradation*, 24(2):203-213.

Mondal P, Majumder CB, Mohanty B (2008) - Growth of three bacteria in arsenic solution and their application for arsenic removal from wastewater. *Journal of Basic Microbiology*, 48(6):521-525.

Moran MA, Torsvik VL, Torsvik T, Hodson RE (1993) - Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:915-918.

Mossmann JR (2000) – Site de la vieille usine à Auzon. Rapport en synthèse des travaux de caractérisation de l'état du site. Recommandations en vue de la réhabilitation du site. Rapport BRGM, R40910, 66p.

Mou XZ, Vila-Costa M, Sun SL, Zhao WD, Sharma S, Moran MA (2011) - Metatranscriptomic signature of exogenous polyamine utilization by coastal bacterioplankton. *Environmental Microbiology Reports*, 3(6):798-806.

Mukhopadhyay R, Li J, Bhattacharjee H, Rosen BP (1998) - Metalloid resistance mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 456:159-181.

Mukhopadhyay R, Rosen BP (2002) - Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environmental Health Perspectives*, 110(5):745-7

Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S (2002) - Microbial arsenic : from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3):311-325.

Muller D, Medigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsene-Ploetze F, Carapito C et al. (2007) - A tale of two oxidation states: Bacterial colonization of arsenic-rich environments. *Plos Genetics*, 3(4).

Mumford AC, Barringer JL, Benzel WM, Reilly PA, Young LY (2012) - Microbial transformations of arsenic: Mobilization from glauconitic sediments to water. *Water Research*, 46(9): 2859-2868.

Murphy JN, Saltikov CW (2009) - The ArsR Repressor Mediates Arsenite-Dependent Regulation of Arsenate Respiration and Detoxification Operons of *Shewanella* sp Strain ANA-3. *Journal of Bacteriology*, 191(21):6722-6731.

Muyzer G, Smalla K (1998) - Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(1):127-141.

N

Naidu R, Kookana RS, Sumner ME, Harter RD, Tiller KG (1997) - Cadmium sorption and transport in variable charge soils: A review. *Journal of Environmental Quality*, 26(3):602-617.

Naidu R, Megharaj M, Krishnamurti GSR, Vig K, Kookana RS (2000) - Bioavailability, definition and analytical techniques for assessment and remediation of contaminated (inorganic and organic) soils. In: Johnston CD, (Ed.), Contaminated site remediation: From Source Zones to Ecosystems. *Proceedings of the Contaminated Site Remediation Conference*, Melbourne, Australia, 283-290

Nelson K. E., Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VA, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu JR, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H,

- Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E et al.** (2002) - Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4:799-808.
- Nercessian O, Bienvenu N, Moreira D, Prieur D, Jeanthon C** (2005) - Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environmental Microbiology*, 7(1):118-132.
- Neyt C, Iriarte M, Thi VH, Cornelis GR** (1997) - Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *Journal of Bacteriology*, 179(3):612-619.
- Nicolaisen MH, Baelum J, Jacobsen CS, Sorensen J** (2008) - Transcription dynamics of the functional *tfdA* gene during MCPA herbicide degradation by *Cupriavidus necator* AEO106 (pRO101) in agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 10(3):571-579
- Nies DH** (2003) - Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3):313-339.
- Nogales B, Timmis KN, Nedwell DB, Osborn AM** (2002) - Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10):5017-5025.
- Nordstrom DK** (2002) - Public health - Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science*, 296(5576):2143-214, 5.
- Norini MP** (2007) - Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization. *Thèse UHP, Nancy 1*.
- Novick R P, Roth C** (1968) - Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 95:1335-1342.
- Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S** (1989) - Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10):3544-3548.

O

- Odum EP** (1985) - Trends Expected in Stressed Ecosystems. *BioScience*, 35:419-422.
- Odermatt A, Suter H, Krapf R, Solioz M** (1993) - Primary Structure of 2 P-Type ATPases Involved in Copper Homeostasis in *Enterococcus-Hirae*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17):12775-12779.
- Ollivier J, Wanat N, Austruy A, Hitmi A, Joussein E, Welzl G, Munch JC, Schlöter M** (2012) - Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Prokaryotes in the Root-Rhizosphere Complex of *Miscanthus x giganteus* Grown in Heavy Metal-Contaminated Soils. *Microbial Ecology*, 64(4):1038-1046.
- Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom D, Sips A** (2003) - Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(3):281-287.
- Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA, Mateos LM** (2005) - Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10):6206-6215.

Oremland RS, Hoefft SE, Santini JA, Bano N, Hollibaugh RA, Hollibaugh JT (2002) - Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10):4795-4802.

Oremland RS, Kulp TR, Blum JS, Hoefft SE, Baesman S, Miller LG, Stolz JF (2005) - A microbial arsenic cycle in a salt-saturated extreme environment. *Science*, 308(5726):1305-1308.

Oremland RS, Stolz JF (2003) - The ecology of arsenic. *Science*, 300(5621):939-944.

Oremland RS, Stolz JF (2005) - Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology*, 13(2):45-49.

Osborne TH, Jamieson HE, Hudson-Edwards KA, Nordstrom DK, Walker SR, Ward SA, Santini JM (2010) - Microbial oxidation of arsenite in a subarctic environment: diversity of arsenite oxidase genes and identification of a psychrotolerant arsenite oxidiser. *BMC Microbiology*, 10.

Ouvrard S, Barnier C, Bauda P, Beguiristain T, Biache C, Bonnard M, Caupert C, Cebron A, Cortet J, Cotellet S et al. (2011) - *In situ* assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management. *International Journal of Phytoremediation*, 13(1):245-263.

P

Paez-Espino D, Tamames J, de Lorenzo V, Canovas D (2009) - Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 22(1):117-130.

Patel PC, Goulhen F, Boothman C, Gault AG, Charnock JM, Kalia K, Lloyd JR (2007) - Arsenate detoxification in a *Pseudomonas* hypertolerant to arsenic. *Archives of Microbiology*, 187(3):171-183.

Pepi M, Lobianco A, Renzi M, Perra G, Bernardini E, Marvasi M, Gasperini S, Volterrani M, Franchi E, Heipieper HJ et al. (2009) - Two naphthalene degrading bacteria belonging to the genera *Paenibacillus* and *Pseudomonas* isolated from a highly polluted lagoon perform different sensitivities to the organic and heavy metal contaminants. *Extremophiles*, 13(5):839-848.

Peršoh D, Theuerl S, Buscot F, Rambold G. (2008) - Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of highpurity nucleic acids from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 75:19-24.

Petrack, JS, Jagadish, B, Mash, E.A, Aposhian, HV (2001) - Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and *in vitro* inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chemical Research In Toxicology*, 14:651-656.

Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, Ceccherini MT, Guerri G, Nannipieri P (2009) - Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45(3):219-235.

Poggio L, Vrscaj B, Schulin R, Hepperle E, Ajmone Marsan F (2009) - Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco Italy. *Environmental Pollution*, 157:680-689.

Poitras E, Houde A (2002) - La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2(2):2-11.

Poretsky RS, Bano N, Buchan A, LeClerc G, Kleikemper J, Pickering M, Pate WM, Moran MA, Hollibaugh JT (2005) - Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7):4121-4126.

Poretsky RS, Hewson I, Sun SL, Allen AE, Zehr JP, Moran MA (2009) - Comparative day/night metatranscriptomic analysis of microbial communities in the North Pacific subtropical gyre. *Environmental Microbiology*, 11(6):1358-1375.

Prosser JI (2002) - Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil*, 244:9–17.

Q

Quemeneur M, Heinrich-Salmeron A, Muller D, Lievreumont D, Jauzein M, Bertin PN, Garrido F, Jouliau C (2008) - Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14):4567–4573.

Quemeneur M, Cebron A, Billard P, Battaglia-Brunet F, Garrido F, Leyval C, Jouliau C (2010) - Population structure and abundance of arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the upper isle River Basin, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13):4566–4570.

R

Rasmussen PE, Beauchemin S, Nugent M, Dugandzic R, Lanouette M, Chénier M (2008) - Influence of matrix composition on the bioaccessibility of Copper, Zinc, and Nickel in urban residential dust and soil. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14:351–371.

RECORD Association (2012) – Biodisponibilité et Bioaccessibilité des polluants dans le cas des sites pollués. Etat des connaissances et pistes de recherche. N° 10-0671/1A, 259 p.

Reich ES (2011) - Conflicting studies fuel arsenic debate. *Nature*, 478(7370):437–438.

Reid GA, Gordon EH (1999) - Phylogeny of marine and freshwater *Shewanella*: reclassification of *Shewanella putrefaciens* NCIMB 400 as *Shewanella frigidimarina*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1):189–91.

Rensing C, Ghosh M, Rosen BP (1999) - Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *Journal of Bacteriology*, 181(19):5891–5897.

Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP (2000) - CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2):652–656.

Rensing C, Grass G (2003) - *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3):197–213.

Rensing C, Mitra B (2007) – Zinc, cadmium, and lead resistance and homeostasis, 321–341. In Nies DH and Silver S (eds.), *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer-Verlag, Berlin.

Reza A, Jean JS, Lee MK, Yang HJ, Liu CC (2010) - Arsenic enrichment and mobilization in the Holocene alluvial aquifers of the Chapai-Nawabganj district, Bangladesh : A geochemical and statistical study. *Applied Geochemistry*, 25(8):1280–1289.

Ribet I, Ptacek CJ, Blowes DW, Jambor JL (1995) - The Potential for Metal Release by Reductive Dissolution of Weathered Mine Tailings. *Journal of Contaminant Hydrology*, 17(3):239–273.

Richey C, Chovanec P, Hoefft SE, Oremland RS, Basu P, Stolz JF (2009) - Respiratory arsenate reductase as a bidirectional enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2):298–302.

Riether KB, Dollard MA, Billard P (2001) - Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* *zntAp :: lux* and *copAp :: lux*-based biosensors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5-6):712–716.

Rodriguez RR, Basta NT (1999) - An in vitro gastrointestinal method to estimate bioavailable arsenic in contaminated soils and solid media. *Environmental Science & Technology*, 33(4):642-649.

Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S (1998) - Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 26:1628-35.

Rosen BP, Bhattacharjee H, Zhou T, Walmsley AR (1999) - Mechanism of the ArsA ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1461(2):207-215

Rosen BP (1999) - Families of arsenic transporters. *Trends Microbiology*, 7(5):207-212.

Rosen BP (2002) - Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letter*, 529(1):86-92.

Rosen BP (2002) - Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 133(3):689-693.

Rosenstein R, Peschel A, Wieland B, Gotz F (1992) - Expression and Regulation of the Antimonite, Arsenite, and Arsenate Resistance Operon of *Staphylococcus-Xylosus* Plasmid-Psx267. *Journal of Bacteriology*, 174(11):3676-3683.

Rowland HAL, Boothman C, Pancost R, Gault AG, Polya DA, Lloyd JR (2009) - The Role of Indigenous Microorganisms in the Biodegradation of Naturally Occurring Petroleum, the Reduction of Iron, and the Mobilization of Arsenite from West Bengal Aquifer Sediments. *Journal of Environmental Quality*, 38(4):1598-1607.

Ruby MV, Schoof R, Brattin W, Goldade M, Post G, Harnois M, Mosby DE, Casteel SW, Berti W, Carpenter M et al. (1999) - Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science & Technology*, 33(21):3697-3705.

S

Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, Schneider K, Elahimanesh P, Hart MM, Trevors JT (2005) - Microbial gene expression in soil : methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1):1-19.

Saleh-Lakha S, Shannon KE, Goyer C, Trevors JT (2011) - Challenges in quantifying microbial gene expression in soil using quantitative reverse transcription real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 85(3):239-243.

Saltikov CW, Cifuentes A, Venkateswaran K, Newman DK (2003) - The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5):2800-2809.

Saltikov CW, Newman DK (2003) - Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19):10983-10988.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory Manual, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanders, O. I., C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, and B. P. Rosen (1997) - Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179:3365-7.

- San Francisco MJD, Hope C, Owolabi JB, Tisa LS, Rosen, BP** (1990) - Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Research*, 18:619-624
- Sayler GS, Fleming JT, Nivens DE** (2001) - Gene expression monitoring in soils by mRNA analysis and gene lux fusions. *Current Opinion of Biotechnology*, 12(5):455-460.
- Selenska S, Klingmüller W** (1992) - Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil. *Microbial Releases*, 1:41-46.
- Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A, Harms H** (2004) - Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology*, 38(12):228A-231A.
- Sessitsch A, Gyamfi S, Stralis-Pavese N, Weilharter A, Pfeifer U** (2002) - RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis : evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods*, 51(2):171-179.
- Shannon KEM, Saleh-Lakha S, Burton DL, Zebarth BJ, Goyer C, Trevors JT** (2011) - Effect of nitrate and glucose addition on denitrification and nitric oxide reductase (*cnorB*) gene abundance and mRNA levels in *Pseudomonas mandelii* inoculated into anoxic soil. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(2):183-195.
- Sharkey FH, Banat IM, Marchant R** (2004) - Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7):3795-3806.
- Sharples JM, Meharg AA, Chambers SM, Cairney JWG** (2000a) - Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae*. *Plant Physiology*, 124(3):1327-1334.
- Sharples JM, Meharg AA, Chambers SM, Cairney JWG** (2000 b) - Evolution - Symbiotic solution to arsenic contamination. *Nature*, 404(6781):951-952.
- Sheik CS, Mitchell TW, Rizvi FZ, Rehman Y, Faisal M, Hasnain S, McInerney MJ, Krumholz LR** (2012) - Exposure of Soil Microbial Communities to Chromium and Arsenic Alters Their Diversity and Structure. *Plos One*, 7(6).
- Shi YM, Tyson GW, DeLong EF** (2009) - Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean's water column. *Nature*, 459(7244):266-U154.
- Siegfried K, Endes C, Bhuiyan A, Kuppardt A, Mattusch J, van der Meer JR, Chatzinotas A, Harms H** (2012) - Field Testing of Arsenic in Groundwater Samples of Bangladesh Using a Test Kit Based on Lyophilized Bioreporter Bacteria. *Environmental Science & Technology*, 46(6):3281-3287.
- Silver S, Budda K, Leahy KM, Shaw WV, Hammond D., Novick RP, Willsky GR, Malamy M H, Rosenberg H** (1981) - Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony(III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 146:983-996.
- Silver S, Phung LT** (2005) - Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2):599-608.
- Simon C, Daniel R** (2011) - Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4):1153-1161.

- Sizmur T, Hodson ME** (2009) - Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? A review. *Environmental Pollution*, 157(7):1981-1989
- Sizmur T, Watts MJ, Brown GD, Palumbo-Roe B, Hodson ME** (2011) - Impact of gut passage and mucus secretion by the earthworm *Lumbricus terrestris* on mobility and speciation of arsenic in contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 197:169-175.
- Slaughter DC, Macur RE, Inskeep WP** (2012) - Inhibition of microbial arsenate reduction by phosphate. *Microbiological Research*, 167(3):151-156.
- Slyemi D, Bonnefoy V** (2012) - How prokaryotes deal with arsenic. *Environmental Microbiology Reports*, 4(6):571-586.
- Smedley PL, Kinniburgh DG** (2002) - A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5):517-568.
- Smith SE, Read DJ** (2008) - Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, London, UK.
- Sohrin Y, Matsui M, Kawashima M, Hojo M, Hasegawa H** (1997) - Arsenic biogeochemistry affected by eutrophication in Lake Biwa, Japan. *Environmental Science & Technology*, 31(10):2712-2720.
- Sterckeman T** (2004) - Caractérisation du fond géochimique en éléments en traces dans les sols issus de roches sédimentaires du Nord de la France. Thèse, INPL, Nancy. Mai 2004, 250 p.
- Sterckeman T, Douay F, Baize D, Fourrier H, Proix N, Schwartz C** (2004) - Factors affecting trace element concentrations in soils developed on recent marine deposits from northern France. *Applied Geochemistry*, 19(1):89-103.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H** (2000) - Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution*, 107(3):377-389.
- Steunou AS, Bhaya D, Bateson MM, Melendrez MC, Ward DM, Brecht E, Peters JW, Kuhl M, Grossman AR** (2006) - *In situ* analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(7):2398-2403.
- Stewart FJ, Sharma AK, Bryant JA, Eppley JM, DeLong EF** (2011) - Community transcriptomics reveals universal patterns of protein sequence conservation in natural microbial communities. *Genome Biology*, 12(3).
- Stolz JF, Basu P, Oremland RS** (2010) - Microbial arsenic metabolism: new twists on an old poison, *Microbe* 5(2):53-59, February
- Stolz JF, Perera E, Kilonzo B, Kail B, Crable B, Fisher E, Ranganathan M, Wormer L, Basu P** (2007) - Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsone) and release of inorganic arsenic by *Clostridium* species. *Environmental Science & Technology*, 41(3):818-823.
- Styblo, M, Del Razo, LM, Vega, L, Germolec, DR, LeCluyse, EL, Hamilton, GA, Reed, W, Wang, C, Cullen, WR, Thomas, DJ** (2000) - Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology*, 74, 289-299.
- Sun Y, Polishchuk EA, Radoja U, Cullen WR** (2004) - Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 58(3):335-349.
- Sunita MSL, Prashant S, Chari PVB, Rao SN, Balaravi P, Kishor PBK** (2012) - Molecular identification of arsenic-resistant estuarine bacteria and characterization of their *ars* genotype. *Ecotoxicology*, 21(1):202-212.

Suzuki K, Wakao N, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K (1998) - Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2):411-418.

T

Takemaru K, Mizuno M, Sato T, Takeuchi M, Kobayashi Y (1995) - Complete nucleotide sequence of a skin element excised by DNA rearrangement during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 141(2):323-327.

Takeno, N (2005) - Atlas of Eh-pH diagrams - Intercomparison of thermodynamic databases.

Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S (2007) - MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1596-9.

Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M (1997) - Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4456-4461.

Tecon R, van der Meer JR (2008) - Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. *Sensors*, 8(7):4062-4080.

Thion C, Cebron A, Beguiristain T, Leyval C (2012) - Long-term in situ dynamics of the fungal communities in a multi-contaminated soil are mainly driven by plants. *Fems Microbiology Ecology*, 82(1):169-181.

Tisa LS, Rosen BP (1990) - Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265(1):190-194.

Trevors JT (1996) - Nucleic acids in the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(3):331-336.

Trinder P (1969) - Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, 22(2):158.

Trolard F., Bourrié G., Jeanroy E., Herbillon A., Martin H. (1995) - Trace metals in natural iron oxides from laterites: a study using selective kinetic extraction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59:1285-1297

Tsai YL, Park MJ, Olson BH (1991) - Rapid Method for Direct Extraction of Messenger-Rna from Seeded Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3):765-768.

Turland M (1985) depot de produits chimiques au lieu dit 'La vieille usine' sur la commune d'Auzon (Haute-Loire), Avis géologique, BRGM 85 AUV 17, 11p.

U

Ulrich N (1998) - Speciation of antimony(III), antimony(V) and trimethylstiboxide by ion chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometric and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 359(3):245-253.

V

van Geen A, Rose J, Thorai S, Garnier JM, Zheng Y, Bottero JY (2004) - Decoupling of As and Fe release to Bangladesh groundwater under reducing conditions. Part II: Evidence from sediment incubations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68:3475–3486.

Van Zwieten L, Ayres MR, Morris SG (2003) - Influence of arsenic co-contamination on DDT breakdown and microbial activity. *Environmental Pollution*, 124(2):331-339.

Vega L, Styblo M, Patterson R, Cullen W, Wang C, Germolec D (2001) - Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172:225–232.

Vialaron C (1998) – L'arsenic : son histoire, son usage, son exploitation dans le département de la Haute-Loire. Ed. Christian Vialaron, 127 p.

Viallard, V, Poirier I, Courmoyer B, Haurat J, Wiebkin S, Ophel-Keller K, and Balandreau J (1998) - *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of *Pseudomonas phenazinium*, *Pseudomonas pyrrocinia* and *Pseudomonas glathei* as *Burkholderia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2):549-63.

Vig K, Megharaj M, Sethunathan N, Naidu R (2003) - Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*, 8(1):121-135.

Villegas-Torres MF, Bedoya-Reina OC, Salazar C, Vives-Florez MJ, Dussan J (2011) - Horizontal *arsC* gene transfer among microorganisms isolated from arsenic polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1):147-152.

W

Wang SL, Mulligan CN (2006) - Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater. *Environmental Geochemistry and Health*, 28(3):197-214.

Wang Y, Shimodaira J, Miyasaka T, Morimoto S, Oomori T, Ogawa N, Fukuda M, Fuiiil T (2008) - Detection of *bphAa* gene expression of *Rhodococcus* sp strain RHA1 in soil using a new method of RNA preparation from soil. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72(3):694-701.

Wang Y, Morimoto S, Ogawa N, Oomori T, Fujii T (2009) - New protocols for the extraction of nucleic acids from soil - a response to Persoh and Rambold's letter. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6).

Wang Y, Morimoto S, Ogawa N, Fujii T (2011) - A survey of the cellular responses in *Pseudomonas putida* KT2440 growing in sterilized soil by microarray analysis. *FEMS Microbiology, Ecol.*78:220–232.

Wang Y, Hayatsu M, Fujii T (2012) - Extraction of Bacterial RNA from Soil: Challenges and Solutions. *Microbes and Environments*, 27(2):111-121.

Willsky GR, Malamy MH (1980) - Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 144:366-374.

Woolson EA (1975) - Arsenical pesticides. *ACS Ser.*, 7:1-176

Wu JH, Rosen BP (1993) - Metalloregulated Expression of the *Ars* Operon. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1):52-58.

Wu FY, Ye ZH, Wu SC, Wong MH (2007) - Metal accumulation and arbuscular mycorrhizal status in metalicolous and nonmetallicolous populations of *Pteris vittata* L. and *Sedum alfredii* Hance. *Planta*, 226(6):1363-1378.

Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S (1997) - The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48):30061-30066.

Wysocki R, Fortier PK, Maciaszczyk E, Thorsen M, Leduc A, Odhagen A, Owsianik G, Ulaszewski S, Ramotar D, Tamas MJ (2004) - Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Molecular Biology of the Cell*, 15(5):2049-2060.

X

Xiong JB, Wu LY, Tu SX, Van Nostrand JD, He ZL, Zhou JZ, Wang GJ (2010) - Microbial Communities and Functional Genes Associated with Soil Arsenic Contamination and the Rhizosphere of the Arsenic-Hyperaccumulating Plant *Pteris vittata* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21):7277-7284.

Xiong JB, He ZL, Van Nostrand JD, Luo GS, Tu SX, Zhou JZ, Wang GJ (2012) - Assessing the Microbial Community and Functional Genes in a Vertical Soil Profile with Long-Term Arsenic Contamination. *Plos One*, 7(11).

Y

Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S (1991) - Cellular-Response to Oxidative Damage in Lung Induced by the Administration of Dimethylarsinic Acid, a Major Metabolite of Inorganic Arsenics, in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108(2):205-213.

Yun JJ, Heisler LE, Hwang IIL, Wilkins O, Lau SK, Hyrcza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS et al. (2006) - Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 34(12).

Z

Zagury GJ, Samson R, Deschenes L (2003) - Occurrence of metals in soil and ground water near chromated copper arsenate-treated utility poles. *Journal of Environmental Quality*, 32(2):507-514.

Zargar K, Conrad A, Bernick DL, Lowe TM, Stolc V, Hoefft S, Oremland RS, Stolz J, Saltikov CW (2012) - ArxA, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environmental Microbiology*, 14(7):1635-1645.

Zhou J, Xia B, Huang H, Palumbo AV, Tiedje JM (2004) - Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:1723-1734

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Classification périodique des éléments.

Annexe 2 : Teneur en arsenic total dans les échantillons de sol prélevés sur le site d'Auzon.

Annexe 3 : Evolution de la concentration d'arsenic dans la terre des parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) après 1 (T2), 2 (T4), 4 (T8) et 5 années (T10) (*Analyses INRA Arras, données GISFI*).

Annexe 4 : Article basé sur la partie III du chapitre "Résultats" : **Arsenite-induced changes in abundance and expression of arsenite detoxification and oxidation genes of a soil microbial community**. Poirel J., Jouliau C., Leyval C., Billard P. (2013) *Research in Microbiology*, 164(5):457-465

Annexe 5 : Article basé sur la partie IV du chapitre "Résultats" : **Rapid impact of phenanthrene and arsenic on bacterial community structure and activities in sand batches**. Cebron A., Arsene-Ploetze F., Bauda P., Bertin P., Billard P., Carapito C., Devin S., Poirel J., Leyval C. (2013) *Microbial Ecology* (in press).

Annexe 1

TABLEAU PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS

TABLEAU PERIODIQUE DES ELEMENTS

http://www.periodni.com/fr/

LEGENDE :

- Métaux
- Métalloïdes
- Non-métaux
- Métaux alcalins
- Chalcogènes
- Métaux alcalino-terreux
- Halogènes
- Métaux de transition
- Gaz nobles
- Lanthanides
- Actinides
- ETAT PHYSIQUE (25 °C, 101 kPa)
 - Ne - gaz
 - Hg - liquide
 - Fe - solide
 - Tc - synthétique

PERIODE	GROUPE IUPAC		GROUPE CAS		GROUPE IUPAC		GROUPE CAS		GROUPE IUPAC		GROUPE CAS		GROUPE IUPAC		GROUPE CAS		GROUPE IUPAC		GROUPE CAS	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	H HYDROGENE																			
2	Li LITHIUM	Be BERYLLIUM																		
3	Na SODIUM	Mg MAGNESIUM																		
4	K POTASSIUM	Ca CALCIUM	Sc SCANDIUM	Ti TITANE	V VANADIUM	Cr CHROME	Mn MANGANESE	Fe FER	Co COBALT	Ni NICKEL	Cu CUIVRE	Zn ZINC	Ga GALLIUM	Ge GERMANIUM	As ARSENIC	Se SELENIUM	Br BROME	Kr KRYPTON		
5	Rb RUBIDIUM	Sr STRONTIUM	Y YTRIUM	Zr ZIRCONIUM	Nb NIOBIUM	Mo MOLYBDENE	Tc TECHNETIUM	Ru RUTHENIUM	Rh RHODIUM	Pd PALLADIUM	Ag ARGENT	Cd CADMIUM	In INDIUM	Sn ETAIN	Sb ANTIMOINE	Te TELLEURE	I IODE	Xe XENON		
6	Cs CESIUM	Ba BARYUM	La-Lu Lanthanides	Hf HAFNIUM	Ta TANTALE	W WOLFRÈME	Re RHÉNIUM	Os OSMIUM	Ir IRIDIUM	Pt PLATINE	Au OR	Hg MERCURE	Tl THALLIUM	Pb PLOMB	Bi BISMUTH	Po POLONIUM	At ASTATE	Rn RADON		
7	Fr FRANCIUM	Ra RADIUM	Ac-Lr Actinides	Rf RUTHÉRFORDIUM	Db DUBNIUM	Sg SEABORGIUM	Bh BOHRILIUM	Hs HASSIUM	Mt MEITNERIUM	Ds DARMSTÄDTIUM	Rg ROENTGENIUM	Cn COPERNICIUM	Uut UNUNTRIUM	Ufl FLEROVIUM	Uup UNUNPENTIUM	Lv LIVERMORIUM	Uus UNUNSEPTIUM	Uuo UNUNOCTIUM		

LANTHANIDES

57 138.91	58 140.12	59 140.91	60 144.24	61 (145)	62 150.36	63 151.96	64 157.25	65 158.93	66 162.50	67 164.93	68 167.26	69 168.93	70 173.05	71 174.97
La LANTHANE	Ce CÉRIUM	Pr PRASEODYME	Nd NÉODYME	Pm PROMÉTHIUM	Sm SAMARIUM	Eu EUROPIUM	Gd GADOLINIUM	Tb TERBIUM	Dy DYSPROSIUM	Ho HOLMIUM	Er ERBIUM	Tm THULIUM	Yb YTBRIUM	Lu LUTÉTIUM

ACTINIDES

89 (227)	90 232.04	91 231.04	92 238.03	93 (237)	94 (244)	95 (243)	96 (247)	97 (247)	98 (251)	99 (252)	100 (257)	101 (258)	102 (259)	103 (262)
Ac ACTINIUM	Th THORIUM	Pa PROTACTINIUM	U URANIUM	Np NEPTUNIUM	Pu PLUTONIUM	Am AMÉRICIUM	Cm CURIUM	Bk BERKÉLIUM	Cf CALIFORNIUM	Es EINSTEINIUM	Fm FERMIUM	Md MENDELÉVIUM	No NOBELIUM	Lr LAURENCIUM

Copyright © 2012 Eni Generali

Annexe 2 : Teneur en arsenic total dans les échantillons de sol prélevés sur le site d'Auzon.

Zone de prélèvement	Numéro de l'échantillon	Valeurs arsenic Niton (mg/kg)
A	1	4490 ± 702
	3	5612 ± 149
	5	7480 ± 573
	6	4138 ± 419
	7	5344 ± 0
C	2	354 ± 0
	4	180 ± 25
D	8	2190 ± 203
	9	9762 ± 155
	10	745 ± 32

Annexe 3 : Evolution de la concentration d'arsenic dans la terre des parcelles de terre nue (NM-TN), colonisées par la végétation spontanée (NM-VS), plantées de luzerne et mycorhizées (NM-MSm) et plantées de luzerne et mycorhizées sur la terre thermo-désorbée (TD-MSm) après 1 (T2), 2 (T4), 4 (T8) et 5 années (T10) (*Analyses INRA Arras, données GISFI*). Les teneurs en arsenic concernant les prélèvements T0 et T6 ne sont pas disponibles

		As total (mg.kg ⁻¹)			
		T2	T4	T8	T10
NM	VS3	55,9	41,2	73,6	87,7
	VS4	58,8	38,3	68,7	88,9
	VS11	44,9	55,6	74,1	73,0
	VS15	49,1	44,9	77,7	78,4
	TN10	36,5	64,1	70,5	81,5
	TN17	53,0	81,2	73,0	85,0
	TN18	55,7	68,2	60,3	69,8
	TN19	51,1	94,5	65,2	76,4
	MSm5	44,0	46,3	75,0	86,0
	MSm6	48,5	45,6	65,0	72,7
	MSm14	57,8	39,8	67,8	86,0
	MSm21	43,8	87,2	62,7	73,1
TD	TD7	51,6	65,1	78,1	89,0
	TD12	69,8	83,7	80,0	89,0
	TD13	73,9	85,0	78,4	87,4
	TD16	44,6	104,0	78,4	89,7

Arsenite-induced changes in abundance and expression of arsenite transporter and arsenite oxidase genes of a soil microbial community

Jessica Poirel ^{a,b}, Catherine Joulian ^c, Corinne Leyval ^{a,b}, Patrick Billard ^{a,b,*}

^a Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^b CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^c BRGM, Environmental BioGeochemistry Unit, Environment, Water and Ecotechnology Department, 3 Avenue Claude Guillemin, 45060 Orléans Cedex 02, France

Received 27 September 2012; accepted 26 January 2013

Available online 6 February 2013

Abstract

We describe a real-time PCR assay for the quantitative detection of *arsB* and *ACR3(1)* arsenite transporter gene families, two ubiquitous and key determinants of arsenic resistance in prokaryotes. The assay was applied in batch growth experiments using a wasteland soil bacterial community as an inoculum to investigate the effect of increasing arsenite [As(III)] concentrations on genes and transcript abundances. The *aioA* gene encoding the large subunit of arsenite oxidase was monitored in parallel. Results showed that *arsB* and *ACR3(1)* gene abundances correlated positively with the As(III) concentration. Both genes showed similar transcription patterns and strong upregulation by arsenic. Microbial As(III) oxidation occurred in As(III) spiked cultures and was associated with expression of the *aioA* gene in most cases. However, *aioA* was also expressed in several non-amended culture replicates. Analysis of cDNA clone libraries revealed that *Pseudomonas* was the dominant metabolically active genus whatever the As(III) concentration. Expressed *arsB* and *ACR3(1)* gene sequences were also affiliated with those from *Pseudomonas*, while expressed *aioA* sequences were more taxonomically diverse. The study suggests that arsenite transporter genes are appropriate biomarkers of arsenic stress that may be suitable for further exploring the adaptive response of bacterial communities to arsenic in contaminated environments.

© 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Bacterial community; Arsenic resistance; Arsenite oxidation; Gene expression; Biomarker

1. Introduction

Arsenic is a widespread toxic metalloid present in the upper crust of the Earth but also in atmospheric dust, seawater and sometimes fresh water, which is a major issue of public health. Its presence in the environment is naturally due to the geochemical background, i.e. the weathering of parent material and

volcanic eruptions, but the main contamination sources are anthropogenic activities such as mining and the metal-working industry (Mukhopadhyay et al., 2002). Arsenic occurs in the environment primarily as inorganic forms of pentavalent arsenate As(V) and trivalent arsenite As(III), with the latter being considered the most mobile and toxic form. Due to its structural similarity to phosphate, As(V) exerts its toxicity by uncoupling oxidative phosphorylation, thereby disrupting ATP synthesis, while As(III) binds to thiol groups, which can result in enzyme inhibition (Oremland and Stolz, 2003).

Because of the environmental ubiquity of arsenic, bacteria have evolved various detoxifying mechanisms that mainly rely on redox reactions and/or efflux systems. The most common pathway for arsenic detoxification is encoded by the *ars* genes,

* Corresponding author. Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, UMR 7360, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

E-mail addresses: jessica.poirel@univ-lorraine.fr (J. Poirel), c.joulian@brgm.fr (C. Joulian), corinne.leyval@univ-lorraine.fr (C. Leyval), patrick.billard@univ-lorraine.fr (P. Billard).

which can be either chromosomal or plasmid-borne (Rosen, 2002). This system basically involves the enzymatic reduction of As(V) by ArsC to As(III), which is pumped out of the cell by a membrane transport protein from *ArsB* or ACR3 unrelated families. Members of the *ArsB* family are prevalent among prokaryotes, but are not found in eukaryotes, and the ACR3 family is even more widespread, with members found in bacteria, archaea and fungi (Achour et al., 2007; Fu et al., 2009; Mansour et al., 2007). The expression of the *ars* operon is controlled by ArsR, an arsenite-responsive transcription regulator that represses gene expression under non-stress conditions and is released from the promoter in response to arsenic exposure, leading to rapid accumulation of As detoxifying enzymes in the cell (Rosen, 1999).

Bacterial oxidation of As(III) has long been regarded as a detoxification process by which As(III) is converted to the less toxic and less mobile form As(V) through an arsenite oxidase, AioAB (formerly AoxAB, AroAB or AsoAB) (Lett et al., 2012). However, As(III) also serves as an electron donor for energy generation in a few chemolithotrophic microorganisms (Silver and Phung, 2005; Stolz et al., 2006). Compared to the *ars* system, the expression of which is controlled only by the arsenic concentration, the regulation of *aioAB* genes appears to be more complex, involving multiple control determinants that may differ depending on the strain (Slyemi and Bonnefoy, 2011).

The soil constitutes a sensitive ecosystem whose functional stability is guaranteed by a large variety of microorganisms involved in a wide range of processes. Numerous studies have shown that metal contamination could significantly affect the structure of soil microbial communities and associated activities; however, major gaps remain in understanding how microorganisms respond to metal exposure in soil (Giller et al., 2009). In the last decade, real-time quantitative PCR (qPCR) has emerged as a sensitive and accurate method for measuring the abundance of phylogenetic or functional gene markers in complex microbial communities. Furthermore, coupling qPCR with reverse transcription (RT-qPCR) provides a powerful means of detecting and quantifying specific messenger RNA (mRNA) transcripts corresponding to the activity of interest in environmental samples (Saleh-Lakha et al., 2011; Smith and Osborn, 2009). Until now, qPCR-based approaches have been used successfully for quantitative detection of functional groups of bacteria involved in biogeochemical cycling of nitrogen, sulfur or carbon, but also of functional genes encoding key enzymes in biodegradation of organic pollutants (Saleh-Lakha et al., 2011; Smith and Osborn, 2009). However, reports on specific molecular markers of metal(loid) stress in the microbial community remain scarce (Bouskill et al., 2007; Sun et al., 2004).

In the present study, we aimed to determine whether the abundance and/or expression of the *arsB*, *ACR3* and *aioA* genes could serve as indicators of arsenic stress and provide a means to assess the impact of arsenic contamination on bacterial communities. A novel qPCR method targeting *arsB* and *ACR3(1)* genes using a set of designed previously primers (Achour et al., 2007) was developed and applied, together with

an *aioA*-targeting qPCR assay (Quemeneur et al., 2010), to investigate the dynamics of arsenite transporter and arsenite oxidase gene abundance and expression in a soil bacterial community exposed to increasing As(III) concentrations in batch growth cultures.

2. Material and methods

2.1. Soil samples

The soil used in this study is an industrial soil from a former coking plant site (Neuves-Maison, France) contaminated by a mixture of PAHs, heavy metals and arsenic. Soil characteristics have been described in previous studies (Cebon et al., 2008). Total arsenic content was 80 ppm. Soil was collected in September 2010 from four plots colonized by spontaneous vegetation (NM-SV) in a long-term field experiment conducted at Homécourt (France; Cebon et al., 2009). Soil samples were combined in a composite sample, sieved to <5 mm and stored field-moist at 4 °C until use.

2.2. Preparation of inoculum and incubation conditions

Indigenous microbial cells were recovered from a total of 100 g of soil by Nycodenz density gradient centrifugation (Lindahl and Bakken, 1995). Briefly, 10 g soil samples were suspended in 30 ml of 0.85% NaCl and homogenized with 10 g glass beads for 1 h at room temperature. The obtained soil slurry (20 ml) was placed in a centrifuge tube above 10 ml of Nycodenz (Abcys SA; density = 1.3 g ml⁻¹) and the tube was centrifuged for 1 h at 10,000 g. The cell fraction was recovered and diluted in sterile water before centrifugation for 20 min at 4000 g to remove Nycodenz. The cell pellet was then suspended in 10 ml of 0.85% NaCl. This bacterial suspension was inoculated to a final concentration of 3×10^5 cells ml⁻¹ into Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 35 ml Bushnell Haas broth (Difco, pH = 7.4) supplemented with 0.4% glucose, 75 µg ml⁻¹ cycloheximide (to inhibit fungal growth) and spiked or not with 10 µM, 100 µM, 1 mM or 10 mM arsenite (NaAsO₂, Merck). These concentrations were chosen to encompass, as far as possible, As(III) concentrations previously shown to robustly induce expression of *ars* genes (e.g. Diorio et al., 1995; López-Maury et al., 2003; Ordóñez et al., 2005; Tauriainen et al., 1997) and the broad range of As(III) resistance levels in bacteria. Cultures of each condition were conducted in triplicate. An additional flask with non-inoculated medium was used as negative control for each arsenite test concentration. The flasks were incubated at 24 °C on a rotary shaker (150 rpm) for 7 days. Samples (8 ml) were taken after 2, 3, 5 and 7 days of incubation for the determination of microbial growth, glucose consumption, pH, arsenic speciation and extraction of nucleic acids.

2.3. Analytical methods

The glucose concentration was measured using a glucose oxidase-peroxidase method (glucose GOD-PAP, BioLabo)

according to the manufacturer's instruction, with absorbance reading at 505 nm using an FLX Xenius spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). Changes in culture optical density were monitored at 600 nm.

The arsenate concentration was determined by ion chromatography using an ICS-3000 HPLC system (Dionex, USA) equipped with an AS autosampler eluent generator, column oven and conductivity detector. An anion-exchange column (IonPac AS11, Dionex) equipped with a guard column (IonPac AG11, Dionex) was used to separate anions.

The total arsenic concentration was determined with ICP-OES after microwave digestion. The concentration of As(III) was determined by calculating the difference between values obtained for total As and As(V).

2.4. DNA and RNA co-extraction and cDNA synthesis

Nucleic acids were extracted from 6 ml cultures using the FastRNA Pro Soil-Direct kit (MP Biomedicals) following the manufacturer's recommendations. After suspension in 200 µl DEPC water (kit protocol step 17), the DNA-RNA mix was divided into two fractions of 150 µl and 50 µl. The former served for RNA purification using the same kit at step 18, while DNA was purified from the 50 µl fraction with the Fast DNA spin kit (MP Biomedicals), starting at step 5. To remove residual DNA, all RNA samples were treated with RNase-free DNase I and cleaned-up with the RNeasy mini-kit (Qiagen). Purified RNA was stored at -80°C until processing. The quality and quantity of total RNA were evaluated by spectrophotometry using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech).

First-strand cDNA was synthesized from approximately 800 ng RNA using random hexamer primers and Superscript III first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). Control reactions lacking reverse transcriptase were performed to ensure the absence of contaminating DNA in the cDNA preparations.

2.5. PCR amplification and gene cloning

Genes involved in arsenite detoxification (*arsB*, *ACR3(1)*) and arsenite oxidation (*aioA*) and the 16S rRNA gene were amplified by PCR from the DNA or cDNA isolated from enrichment cultures of this study, or from reference strains or plasmids (see below). Reactions were performed in a Bio-Rad iCycler machine. Details about primer pairs and cycling conditions have been described previously (Achour et al., 2007; Quemeneur et al., 2010). PCR products were purified (E.Z.N.A Cycle-Pure Kit, Omega Bio-Tek), ligated into the pGEM-T vector (Promega) and transformed into TOP10 chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen). Transformants forming white colonies on LB agar with ampicillin ($100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) and X-Gal ($20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) were screened for the presence of insert by direct-colony PCR using appropriate primer pairs. For each target gene in As-free, 1 mM and 10 mM As(III) after 5 days, plasmids from a random selection of positive clones (6–10 clones for *arsB*,

ACR3(1) and *aioA* genes, 10 to 18 clones for 16S rRNA gene) were purified using the Qiaprep Spin Mini-kit (Qiagen) and sequenced (Eurofins MWG).

2.6. Real-time PCR assay

Standards for real-time PCR were prepared as follows: partial *arsB*, *ACR3(1)* and *aioA* gene fragments were amplified by PCR using the appropriate primer pair from plasmids pUM3 (Mobley et al., 1983), pF1 (Achour-Rokbani et al., 2010) and *Alcaligenes* sp. YI013H genomic DNA (Quemeneur et al., 2008), respectively, and cloned into the pGEM-T vector. Plasmid standard for 16S rRNA genes was prepared as described by Cebron et al. (2008). All plasmids were linearized at a unique BamHI site to prevent erroneous calibration due to coiled DNA. The constructs were serially diluted to 10^8 to 10 copies μl^{-1} in double-distilled water and used to generate the standard curves. The DNA concentration was quantified by spectrophotometry and the gene copy number was calculated according to the pGEM-T and cloned gene sequence lengths, assuming a molecular mass of 660 Da for a base pair. qPCR of *aioA* and 16S rRNA genes was done as described by Quemeneur et al. (2010) and Cebron et al. (2008), respectively. For qPCR of *arsB* and *ACR3(1)*, primer pairs darsB1F/darsB1R (5'-GGTGTGGAA CATCGTCTGGAAYGCNAC-3'/5'-CAGGCCGTACACCAC CAGRTACATNCC-3') and dacr1F/dacr1R (5'-GCCATCGG CCTGATCGTATGATGTAYCC-3'/5'-CGGCGATGGCCA GCTCYAAYTTYTT-3') (Achour et al., 2007) were used. The same amplification conditions were applied to both genes. Reactions were performed in a total volume of 20 µl containing 1 X iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.4 µM of each primer, 0.6 µg μl^{-1} of bovine serum albumin, 0.2 µl of dimethylsulfoxide, 0.08 µl of T4 bacteriophage gene 32 product (QBiogene) and 1 µl of template DNA or distilled water for the negative control. Cycling conditions consisted of 5 min of denaturation at 95°C followed by 50 cycles of 30 s of denaturation at 95°C , 30 s of annealing at 53°C and 30 s of primer extension at 72°C and a final extension step of 7 min at 72°C . A melting curve analysis was performed at the end of each run to check amplification specificity. PCR inhibition was assessed on a random selection of DNA extracts by spiking samples with known amounts (10^4 to 10^7 copies) of *ACR3(1)* plasmid standard. None of the tested samples showed PCR inhibition. All runs were performed in an iCycler iQ (Bio-Rad) associated with iCycler Optical System Interface software (version 2.3; Bio-Rad). Amplicons obtained from real-time PCR assays were cloned and sequenced as described above for conventional PCR products.

2.7. Data analysis

The real-time PCR data presented in the following sections are the means ($n = 6$) from two independent runs, each performed on triplicate samples. Samples were scored as positive if targeted genes were quantified into two or three replicates. Samples testing positive in one replicate were scored as positive only if detected in the two runs. Samples testing positive

in only one of the two runs were considered ambiguous and not included in subsequent analyses.

The ratios of arsenic genes (*arsB*, *ACR3(1)* and *aioA*) relative to 16S rRNA genes and of transcripts relative to target genes were analyzed through two-way analysis of variance (ANOVA) with $\alpha = 0.05$. Correlations between gene abundance and arsenite concentration were tested using the Pearson correlation coefficient. All statistical analyses were carried out using XLSTAT 2011 software (Addinsoft).

3. Results

3.1. Efficiency of real-time PCR primers targeting *arsB* and *ACR3(1)*

Two primer pairs enabling separate amplification of *arsB* and *ACR3(1)* families of arsenite transporter genes were applied to real-time PCR. The amplification of the two genes was found to be optimal with an annealing temperature of 53 °C. We also included an extension step at 72 °C, as the two primer pairs targeted a rather large region of approximately 750 bp. When amplifying *arsB* from the standard plasmid, a positive log linear correlation ($R^2 = 0.990$ to 0.998) was observed between the copy number and PCR threshold cycle number, covering 6-log units between 10^2 and 10^8 copies/reaction (Fig. S1). Similar quantitative linearity ($R^2 = 0.990$ to 0.997) was reproducibly shown from 10^1 to 10^8 copies per reaction for *ACR3(1)* calibration curves. The mean qPCR efficiencies were 100.6% for *arsB* and 97.1% for *ACR3(1)*. In both cases, melting curves showed a single peak, indicating specific amplification and no significant primer dimer

formation. In subsequent analyses of microbial community DNA or cDNA, all qPCR products yielded single bands of the expected size on agarose gel, confirming the specificity of the two primer pairs.

3.2. Impact of arsenite on the growth and arsenite oxidation activity of a Nycodenz-extracted soil bacterial community

Bacterial growth in batch experiments was affected by As(III) in a dose-dependent manner. At the lowest As(III) concentration (10 μ M), the growth curve did not differ from the control, while initial growth rates were reduced at 100 μ M and 1 mM As(III) (Fig. 1A). The maximal inhibitory effect was observed at 10 mM As(III), where the onset of growth was delayed for 48 h. Correlatively, the rates of glucose consumption and of the resulting medium acidification were reduced as the As(III) concentration increased (Fig. 1B and C). The inoculum displayed As(III) oxidation activity, even at low As(III) concentrations (10 μ M and 100 μ M), where As(V) was detected in the medium after 48 h incubation. In flasks spiked with 1 mM As(III), conversion to As(V) also started after 48 h and was complete after 120 h, while it was delayed and incomplete at the end of incubation in the presence of 10 mM As(III) (Fig. 1D). It should be noted that for the latter concentration, large variations in As(III) oxidizing activity, but also pH and glucose consumption, were seen among the three replicates, suggesting selection of different bacterial populations, likely due to As(III) toxicity. The observed chemical modifications of the medium were attributable to microbial activity, as evidenced by the absence of significant variation in

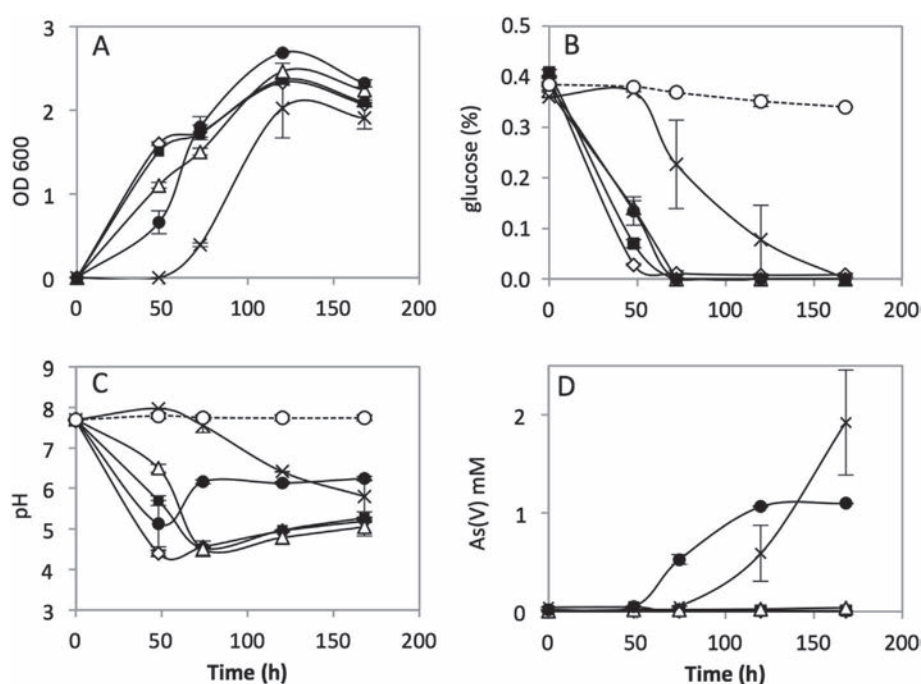


Fig. 1. Time evolution of (A) bacterial growth at OD_{600nm}, (B) glucose concentration, (C) pH, (D) arsenate (As(V)) concentration in cultures spiked with different arsenite concentrations and in arsenic-free controls. Spiking concentrations are: $\diamond$, 0 μ M; $\blacksquare$, 10 μ M; $\triangle$, 100 μ M; $\bullet$, 1 mM; $\times$, 10 mM As(III). Abiotic controls ($\circ$) consist of arsenic-free medium receiving no bacterial inoculum. Data are mean values $\pm$ SEM ($n = 3$).

the initial medium characteristics in non-inoculated assays (abiotic control).

3.3. Abundance and expression of *arsB*, *ACR3(1)*, *aioA* and 16S rRNA genes

In order to investigate whether bacterial arsenite transporter and arsenite oxidase genes were overexpressed during mid-term As(III) exposure, culture aliquots were taken for DNA and RNA co-extraction at different incubation times after inoculation, and subsequent quantification of *arsB*, *ACR3(1)*, *aioA* and 16S rRNA gene fragments and respective transcripts was performed by real-time PCR.

Both arsenite transporters and arsenite oxidase-encoding genes were detected in the inoculum. *ACR3(1)* genes were present at $8.2 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-4}$ copies per 16S rRNA gene copy, while *arsB* and *aioA* genes were significantly less abundant, with $2.4 \times 10^{-3} \pm 1.9 \times 10^{-4}$ and $1.6 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-4}$ copies per 16S rRNA gene copy, respectively.

Overall, the abundance of *arsB* gene did not change over time, but was affected by the As(III) concentration, with higher values observed at 1 mM and 10 mM As(III) (Fig. 2A). The *ACR3(1)* gene copy number showed a similar trend with respect to arsenic concentration, i.e. it was at a maximal level at 1 mM As(III), but was also altered over time (Fig. 2B). In contrast to arsenite transporter genes, the abundance of *aioA* was significantly lower at high arsenite concentrations (1 mM and 10 mM As(III)). However, the *aioA* copy number also changed over time, as observed for

ACR3(1) (Fig. 2C). There was no significant interaction between arsenite concentration and time for the two latter genes. Interestingly, Pearson's correlation analysis revealed that both *arsB* and *ACR3(1)* gene abundances were correlated with the As(III) concentration, while no such relationship was noted for *aioA* (Table 1).

The transcriptional activity of *arsB*, as measured by gene-copy-normalized transcript abundance (*arsB* mRNA/DNA ratio), was undetectable in the As(III)-free control as well as at a low As(III) concentration (10 μ M) throughout the experiment (Fig. 3A). Incubation with higher As(III) concentrations led to dramatic increases in *arsB* transcriptional activity after 72 h. In cultures spiked with 100 μ M As(III), maximal gene expression occurred after 72 h and was followed by a progressive decrease to an undetectable level after 168 h. In contrast, at 1 mM and 10 mM As(III), expression rose to maximal levels later, at 120 h, and subsequently decreased. The transcription dynamics of the second arsenite transporter-encoding gene *ACR3(1)* showed striking similarities with that of *arsB* (Fig. 3B). The only noticeable differences were in higher levels of *ACR3(1)* expression at 10 mM As(III) and a more rapid drop in expression at 100 μ M As(III). As observed for arsenite transporter genes, transcripts of *aioA* were first detected after 72 h of incubation in As(III) spiked cultures, but also in one of the three As(III)-free replicate controls (Fig. 3C). This transcription was detected in a second As(III)-free replicate after 120 h and remained at a level similar to that of As(III) spiked cultures. *aioA* transcripts were never detected at 10 mM As(III).

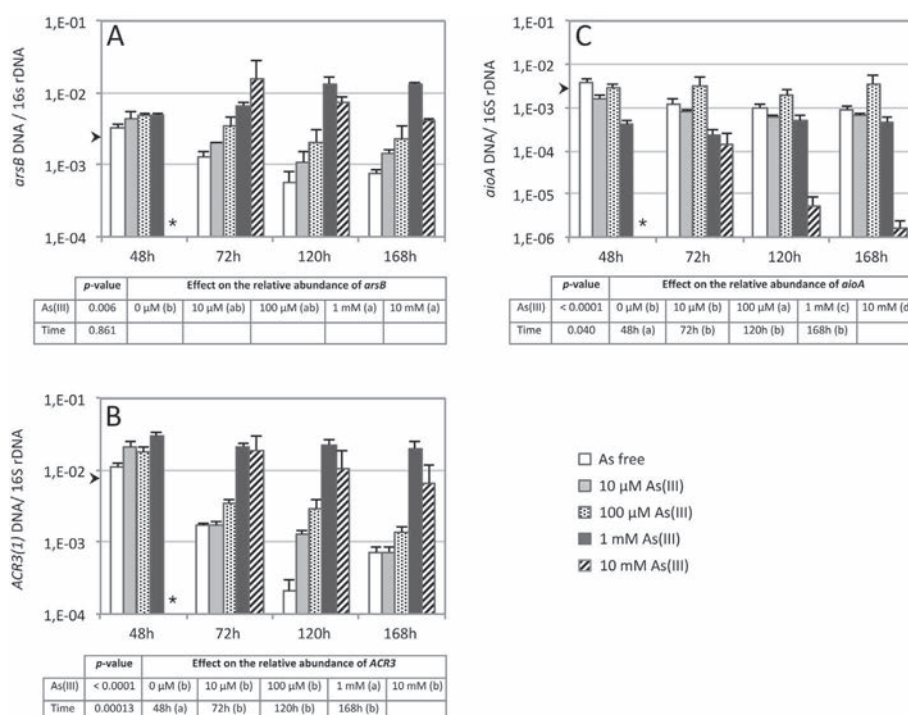


Fig. 2. Time evolution of the relative abundance (gene copy number/16S rRNA gene copy number ratios) of (A) *arsB*, (B) *ACR3(1)* and (C) *aioA* genes in arsenite spiked cultures and arsenite-free controls, determined by real-time PCR. Data are mean values $\pm$ SEM ($n = 3$). The tables below each chart show results of two-way ANOVA, with different letters indicating significant differences ($p < 0.05$). Arrows (►) indicate relative abundance of each target gene in the inoculum. Values below the limit of detection are indicated by an asterisk (*).

Table 1

Pearson's correlation analyses of bacterial gene abundance with total arsenic concentration at sampling times.

Gene abundance	Pearson's correlation coefficient (<i>p</i> -value) ^a			
	As-48 h	As-72 h	As-120 h	As-168 h
16S rDNA/ μ g DNA	0.041 (0.899)	0.382 (0.221)	0.639 (0.064)	0.724 (0.012)
<i>arsB</i> / μ g DNA	0.712 (0.009)	0.834 (<0.001)	0.899 (0.001)	0.927 (<0.001)
<i>arsB</i> /16S rRNA	0.499 (0.099)	0.841 (<0.001)	0.934 (<0.001)	0.944 (<0.001)
<i>ACR3</i> / μ g DNA	0.727 (0.007)	0.850 (<0.001)	0.958 (<0.001)	0.875 (<0.001)
<i>ACR3</i> /16S rRNA	0.676 (0.016)	0.881 (<0.001)	0.956 (<0.001)	0.854 (<0.001)
<i>aioA</i> / μ g DNA	−0.457 (0.135)	0.465 (0.128)	0.458 (0.215)	0.569 (0.068)
<i>aioA</i> /16S rRNA	−0.722(0.008)	−0.452 (0.140)	−0.337 (0.375)	−0.142 (0.678)

^a Significant (<0.05) *p*-values for the correlations are indicated in bold. Note that abundances of the *ACR3(I)* gene at 10 mM As(III) were not included in the analysis.

We also calculated the 16S rRNA to rDNA ratios to estimate the growth state of bacteria during batch experiments. These ratios sharply increased between 48 h and 72 h of incubation during the exponential growth phase and remained at a maximal level or slightly decreased when entering into stationary phase (Fig. 3D). Comparison of the dynamics of gene expression showed that high transcript levels of *arsB*, *ACR3(I)* and *aioA* occurred mostly at high 16S rRNA to rDNA ratios, i.e. during the period of active cell growth or shortly thereafter.

3.4. Diversity of expressed *arsB*, *ACR3(I)*, *aioA* and 16S rRNA genes

16S rRNA clone libraries were prepared from 120-h old cultures exposed to 1 mM and 10 mM As(III), as well as from unspiked control cultures, to investigate the diversity of metabolically active populations. The phylogenetic analysis of 46 clones revealed that they were all affiliated with the genus *Pseudomonas* except for one clone related to the genus *Enterobacter* (Table 2). The two dominant *Pseudomonas*-

related sequences were recovered from both the control and arsenic-spiked cultures, while the *Enterobacter*-related sequence was detected only in As(III)-free cultures. Consistently, cDNA clone library analyses of arsenite transporter genes also indicated sequences most similar to that of *Pseudomonas* species. In the case of *aioA*, a single sequence affiliated with *Pseudomonas* was expressed in the absence of arsenic. This sequence turned out to be present at 1 mM As(III), but was also accompanied by four other *aioA*-like sequences showing diverse taxonomic affiliations.

4. Discussion

The adaptive response of microbial communities to arsenic in contaminated environments is still poorly understood. In this study, we describe SYBR-Green-based real-time PCR assays to explore this response through measurement of the abundance and expression of arsenite transporter and arsenite oxidase genes, two key components of bacterial tolerance to this metalloid.

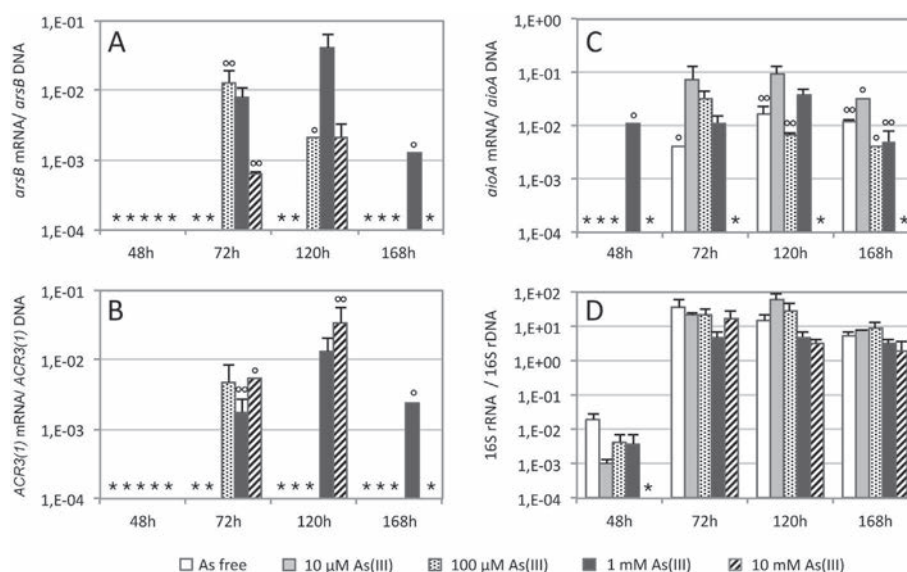


Fig. 3. Time evolution of the expression (mRNA copy number/gene copy number ratios) of (A) *arsB*, (B) *ACR3(I)*, (C) *aioA* and (D) 16S rRNA genes in arsenite-spiked cultures and arsenite-free controls, determined by real-time PCR. Data are mean values $\pm$ SEM ($n = 3$). Relative expression values determined on one or two of three replicates are marked by one (○) or two (○○) circles, respectively. Values below the limit of detection are indicated by an asterisk (*).

Table 2

Origin and nearest GenBank neighbors of partial *arsB*, *ACR3(1)*, *aioA* and 16S rRNA gene sequences expressed in batch growth cultures.

Gene	Clone ID (accession no.)	Number of clones recovered ^a			Nearest BLAST match (accession no.)	Nucleotide identity (%)
		Control	As(III) 1 mM	As(III) 10 mM		
<i>16S</i>	NM16S_1 (JX863389)	8	8	12	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> NFM421 (DQ178233)	99
	NM16S_2 (JX863390)	—	10	6	<i>Pseudomonas putida</i> HS–N24 (EF100617)	99
	NM16S_3 (JX863391)	1	—	—	<i>Enterobacter cancerogenus</i> PSB20 (HQ242733)	99
	NM16S_4 (JX863392)	1	—	—	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. 19318_ZC5M6_G12 (JQ897449)	99
<i>arsB</i>	NMarsB_1 (JX863398)	—	3	4	Uncultured bacterium clone ArsBCarn_43(FR847155)	80
	NMarsB_2 (JX863399)	—	1	—	<i>Pseudomonas</i> sp. A23 (AM283014)	74
	NMarsB_3 (JX863400)	—	1	—	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 (AM181176)	86
	NMarsB_4 (JX863401)	—	2	2	<i>P. fluorescens</i> A506 (CP003041)	88
<i>aioA</i>	NMaioA_1 (JX863393)	10	3	—	<i>Pseudomonas</i> sp. 46 (EU304277)	99
	NMaioA_2 (JX863394)	—	3	—	Uncultured bacterium <i>aioA</i> , clone EM-2d2 (AB730899)	94
	NMaioA_3 (JX863395)	—	1	—	Uncultured bacterium clone T12RSOL19 (EU304310)	90
	NMaioA-4 (JX863396)	—	1	—	<i>Acinetobacter</i> sp.33 (EU304275)	89
	NMaioA-5 (JX863397)	—	1	—	Enrichment culture clone aoxheteroA80_4W (ADF47247)	99
<i>ACR3(1)</i>	NMACR3_1 (JX863402)	—	3	9	<i>P. putida</i> ND6 (CP003588)	90

^a Sequences sharing more than 97% identity were considered to be in the same relatedness group.

Primers targeting *arsB* and *ACR3(1)* were previously shown to be highly specific and enabled amplification of arsenite transporter gene sequences from a taxonomically wide range of bacteria (Achour et al., 2007). Further to this, the specificity of these primers was confirmed in a number of environmental studies dealing with the impact of arsenic on the structure and diversity of microbial communities (e.g. Bachate et al., 2009; Cai et al., 2009a,b; Cavalca et al., 2010; Corsini et al., 2010; Hoeft et al., 2010; Sheik et al., 2012). However, the PCR method was not quantitatively applied to environmental samples. While short amplicon lengths are generally recommended for maximizing PCR efficiency in real-time PCR, we chose to optimize cycling conditions with the initial sets of primers rather than designing new primers to produce shorter amplicons. This choice proved fruitful, as the optimized assays enabled amplification of the two 0.75 kb templates, which are larger than typically used for real-time PCR, with efficiencies close to 100% and large dynamic ranges of detection.

The response of the soil microbial community to arsenic stress was studied on Nycodenz-extracted cells instead of soil microcosms. In this way, we overcame difficulties associated with isolating RNA from soil and subsequent RT-qPCR measurements (Saleh-Lakha et al., 2011). This also avoided adsorption on soil mineral phases of As(III) and As(V) resulting from microbial oxidation, and ensured that most arsenic present in the growth medium was available to the bacteria. While the bacterial inoculum investigated here proved to be highly diverse (Cebon et al., 2009), phylogenetic analysis revealed a sharp reduction in diversity after 5 day incubation, with *Pseudomonas* being the dominant metabolically active genus in all tested conditions. The shift in diversity appeared to be independent of the arsenic level, but might rather be attributed to use of glucose as a sole carbon source in the culture medium. Indeed, many of the *Pseudomonas* species are known to be typical r-strategists (van Overbeek and van Elsas, 1997) which tend to be strongly favored under nutrient-rich conditions, e.g. as reported in soils

amended with glucose (Jenkins et al., 2010). It is, however, noteworthy that the dominant *aioA* genes expressed shifted from single *Pseudomonas*-related sequences in arsenic-free cultures to more taxonomically diverse sequences at 1 mM As(III). This indicates the presence of weakly abundant non-*Pseudomonas* active populations that were not detected from 16S cDNA library analysis, but likely played an important role in As(III) oxidation. We also noted that *Pseudomonas*-related *arsB* sequences were more diverse than *ACR3(1)* sequences (4 *arsB* vs. 1 *ACR3(1)*). This might appear unexpected given the wide occurrence of both transporter families in bacteria. It should be kept in mind that gene primers targeting *ACR3* in this study only amplify the *ACR3(1)* group of arsenite transporter genes and could not capture the whole diversity of the *ACR3* gene family. Nevertheless, because 16S rRNA and functional gene sequences recovered were weakly diverse, correlations between gene diversity and the level of arsenic concentration, as assessed by others (Sheik et al., 2012), were not investigated.

One purpose of this work was to examine the links between the abundance of arsenite efflux pumps and arsenite oxidase genes, their expression level and the level of arsenic stress. Such investigations on arsenic and other metal resistance genes could be conducted only in rare cases where suitable quantitative PCR methods were available (Bouskill et al., 2007; Sun et al., 2004). However, application of high-throughput molecular tools provides a growing body of evidence that metal(loid) efflux pumps play an important role in the adaptation of bacterial communities to metal(loid) stress in contaminated environments. For instance, strong linkages were established between the level of arsenic contamination, the rhizosphere of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vitata* and arsenic resistance gene distribution using functional gene (GeoChip) microarray (Xiong et al., 2010). Recent analyses of microbial communities using similar GeoChip arrays or metagenomics also indicated an overabundance of metal resistance genes in metal-rich environments (Hemme et al., 2010;

Reith et al., 2012). Using newly developed real-time PCR assays, we found strong positive correlations between changes in *arsB* and *ACR3(1)* gene abundance and arsenic levels during the entire incubation time. The fact that the two genes showed similar patterns of abundance while differing from that of the *aioA* gene underscores the importance of As(III) efflux mechanisms in short-term adaptation of bacteria to arsenic stress. Whether they contribute to the adaptive response of microbial communities to long-term arsenic exposure remains to be determined and the real-time PCR assays developed here should help in addressing this issue.

We further established that upregulation of both *arsB* and *ACR3(1)* genes occurred after three-day exposure to As(III) concentrations above 100 μ M. The upregulation in itself was expected, since the expression of most known *ars* operon is regulated by arsenic. However, transcription analyses of *ars* genes in different bacterial species indicated that derepression generally occurs at a lower As(III) concentration (in the range of 1–10 μ M As; Diorio et al., 1995; López-Maury et al., 2003; Ordóñez et al., 2005; Tauriainen et al., 1997) than those observed here and within hours of exposure. A possible explanation for these discrepancies may stem from suboptimal efficiency of the reverse transcription protocol that could affect cDNA yield or length and thereby decrease the sensitivity of the totality of RT-qPCR assays. Nevertheless, our results are noteworthy since they provide first evidence of As(III)-induced changes in the transcription of arsenic resistance genes at the community level.

The abundance and expression of *aioA* were successfully quantified in batch growth cultures using a previously developed real-time PCR assay (Quemeneur et al., 2010). As might be expected for a bacterial community inhabiting long-term arsenic-contaminated soil, the *aioA* gene was abundantly present in the inoculum, suggesting a high potential for As(III) oxidation. Microbial As(III) oxidation indeed occurred in As(III)-spiked cultures and was consistently associated with expression of the *aioA* gene in most cases. The fact that four of five *aioA*-like sequences expressed at 1 mM As(III) were not detected in control cultures implies that these genes are likely regulated by arsenic, which is a characteristic feature of most As(III)-oxidizing bacteria (Slyemi and Bonnefoy, 2011). However, the *aioA* gene was also expressed in several non-amended culture replicates. Arsenite oxidase activity in the absence of As(III) has been reported in a few strains including *Thiomonas* sp. 3As (Duquesne et al., 2008), *Ralstonia* sp. 22 (Lieutaud et al., 2010), the psychrotolerant arsenite oxidizer GM1 (Osborne et al., 2010) and *Agrobacterium tumefaciens* 5A (Kashyap et al., 2006); however in that latter case As(III) oxidation appeared to be regulated by quorum sensing and occurred only in the late growth phase. Our results suggest that basal expression of arsenite oxidase may also occur in some *Pseudomonas* strains, which contrasts with a previous report on *Pseudomonas* sp. TS44 that exhibits no obvious *aioA* expression in the absence of arsenic (Cai et al., 2009a,b). Also intriguing were the continuous decrease in *aioA* gene abundance over time and undetectable *aioA* transcripts at 10 mM As(III) despite strong arsenite

oxidase activities. It is unclear whether this results from low sensitivity of the RT-qPCR assay or from failure to amplify an unusual arsenite oxidase gene with divergent target sequences. Together with the lack of correlation between *aioA* abundance and As(III) concentration, these results suggest that arsenite oxidase expression may not be a suitable marker for arsenic stress.

In summary, we have developed a real-time PCR assay that can be used to accurately quantify the two major families of arsenite transporter genes in natural bacterial communities. Despite biases resulting from cultivation of the community, we showed that the abundance of arsenite efflux pump genes correlated with the As(III) concentration, whereas that of *aioA* gene did not. Furthermore, only *arsB* and *ACR3(1)* displayed clear arsenic-dependent upregulation. Considering their inducibility and widespread distribution among prokaryotes, both genes appear to be promising functional biomarkers for environmental arsenic stress and bioavailability. Further studies on the abundance and expression of *arsB* and *ACR3(1)* in indigenous soil bacterial communities exposed to different levels of arsenic over various periods of time should help to gain a better understanding of how these genes contribute to the adaptation of communities to arsenic stress and their role in shaping community structure and diversity.

Acknowledgments

Special thanks are due to A. Cébron for her guidance in real-time PCR. We acknowledge the GISFI (www.gisfi.fr) for providing soil samples. This work was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (Multipolsite project). J. Poirel gratefully acknowledges the support of the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) and the Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2013.01.012>.

References

- Achour, A.R., Bauda, P., Billard, P., 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158, 128–137.
- Achour-Rokhani, A., Cordi, A., Poupin, P., Bauda, P., Billard, P., 2010. Characterization of the *ars* gene cluster from extremely arsenic-resistant microbacterium sp. strain A33. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 948–955.
- Bachate, S.P., Cavalca, L., Andreoni, V., 2009. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *J. Appl. Microbiol.* 107, 145–156.
- Bouskill, N.J., Barnhart, E.P., Galloway, T.S., Handy, R.D., Ford, T.E., 2007. Quantification of changing *Pseudomonas aeruginosa* *sodA*, *htrX* and *mtg* gene abundance in response to trace metal toxicity: a potential in situ biomarker of environmental health. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 276–286.
- Cai, L., Liu, G., Rensing, C., Wang, G., 2009a. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol.* 9, 4.
- Cai, L., Rensing, C., Li, X., Wang, G., 2009b. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *achromobacter*

- sp. SY8 and *Pseudomonas* sp TS44. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 715–725.
- Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E., Andreoni, V., 2010. Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *System. Appl. Microbiol.* 33, 154–164.
- Cebon, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M.-P., Masfaraud, J.-F., Leyval, C., 2009. Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6322–6330.
- Cebon, A., Norini, M.-P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD alpha) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73, 148–159.
- Corsini, A., Cavalca, L., Crippa, L., Zaccheo, P., Andreoni, V., 2010. Impact of glucose on microbial community of a soil containing pyrite cinders: role of bacteria in arsenic mobilization under submerged condition. *Soil Biol. Biochem.* 42, 699–707.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., DuBow, M.S., 1995. An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177, 2050–2056.
- Duquesne, K., Lieutaud, A., Ratouchniak, J., Muller, D., Lett, M.-C., Bonnefoy, V., 2008. Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ. Microbiol.* 10, 228–237.
- Fu, H.-L., Meng, Y., Ordonez, E., Villadangos, A.F., Bhattacharjee, H., Gil, J.A., Mateos, L.M., Rosen, B.P., 2009. Properties of arsenite efflux Permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 284, 19887–19895.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2031–2037.
- Hemme, C.L., Deng, Y., Gentry, T.J., Fields, M.W., Wu, L., Barua, S., Barry, K., Tringe, S.G., Watson, D.B., He, Z., Hazen, T.C., Tiedje, J.M., Rubin, E.M., Zhou, J., 2010. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J.* 4, 660–672.
- Hoeft, S.E., Kulp, T.R., Han, S., Lanoil, B., Oremland, R.S., 2010. Coupled arsenotrophy in a hot spring photosynthetic biofilm at Mono Lake, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4633–4639.
- Jenkins, S.N., Rushton, S.P., Lanyon, C.V., Whiteley, A.S., Waite, I.S., Brookes, P.C., Kemmitt, S., Evershed, R.P., O'Donnell, A.G., 2010. Taxon-specific responses of soil bacteria to the addition of low level C inputs. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1624–1631.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J., McDermott, T.R., 2006. Complex regulation of arsenite oxidation in *agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 188, 1081–1088.
- Lett, M.-C., Muller, D., Lièvremon, D., Silver, S., Santini, J., 2012. Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *J. Bacteriol.* 194, 207–208.
- Lieutaud, A., van Lis, R., Duval, S., Capowiez, L., Muller, D., Lebrun, R., Lignon, S., Fardeau, M.-L., Lett, M.-C., Nitschke, W., Schoepp-Cothenet, B., 2010. Arsenite oxidase from *Ralstonia* sp. 22: characterization of the enzyme and its interaction with soluble cytochromes. *J. Biol. Chem.* 285, 20433–20441.
- Lindahl, V., Bakken, L.R., 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 135–142.
- López-Maury, L., Florencio, F.J., Reyes, J.C., 2003. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 185, 5363–5371.
- Mansour, N.M., Sawhney, M., Tamang, D.G., Vogl, C., Saier, M.H., 2007. The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* 274, 612–629.
- Mobley, H., Chen, C.-M., Silver, S., Rosen, B., 1983. Cloning and expression of R-factor mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 191, 421–426.
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T., Silver, S., 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 311–325.
- Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J.A., Mateos, L.M., 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6206–6215.
- Oremland, R.S., Stolz, J.F., 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300, 939–944.
- Osborne, T.H., Jamieson, H.E., Hudson-Edwards, K.A., Nordstrom, D.K., Walker, S.R., Ward, S.A., Santini, J.M., 2010. Microbial oxidation of arsenite in a subarctic environment: diversity of arsenite oxidase genes and identification of a psychrotolerant arsenite oxidizer. *BMC Microbiol.* 10, 205.
- van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D., 1997. Adaptation of bacteria to soil conditions: applications of molecular physiology in soil microbiology. In: Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 441–477.
- Quemeneur, M., Heinrich-Salmeron, A., Muller, D., Lièvremon, D., Jauzein, M., Bertin, P.N., Garrido, F., Leyval, C., Joulain, C., 2008. Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4567–4573.
- Quemeneur, M., Cebon, A., Billard, P., Battaglia-Brunet, F., Garrido, F., Leyval, C., Joulain, C., 2010. Population structure and abundance of arsenite-oxidizing bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the upper Isle river basin, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4566–4570.
- Reith, F., Brugger, J., Zammit, C.M., Gregg, A.L., Goldfarb, K.C., Andersen, G.L., DeSantis, T.Z., Piceno, Y.M., Brodie, E.L., Lu, Z., He, Z., Zhou, J., Wakelin, S.A., 7 June 2012. Influence of geogenic factors on microbial communities in metallogenic Australian soils. *ISME J.* <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.48>
- Rosen, B.P., 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* 7, 207–212.
- Rosen, B.P., 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529, 86–92.
- Saleh-Lakha, S., Shannon, K.E., Goyer, C., Trevors, J.T., 2011. Challenges in quantifying microbial gene expression in soil using quantitative reverse transcription real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 85, 239–243.
- Sheik, C.S., Mitchell, T.W., Rizvi, F.Z., Rehman, Y., Faisal, M., Hasnain, S., McInerney, M.J., Krumholz, L.R., 2012. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure. *PLoS One* 7, e40059.
- Silver, S., Phung, L.T., 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 599–608.
- Slyemi, D., Bonnefoy, V., 2011. How prokaryotes deal with arsenic. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 571–586.
- Smith, C.J., Osborn, A.M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 6–20.
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M., Oremland, R.S., 2006. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 107–130.
- Sun, Y., Polishchuk, E.A., Radoja, U., Cullen, W.R., 2004. Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 58, 335–349.
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., Virta, M., 1997. Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4456–4461.
- Xiong, J., Wu, L., Tu, S., Van Nostrand, J.D., He, Z., Zhou, J., Wang, G., 2010. Microbial communities and functional genes associated with soil arsenic contamination and the rhizosphere of the arsenic-hyperaccumulating plant *Pteris vittata* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7277–7284.