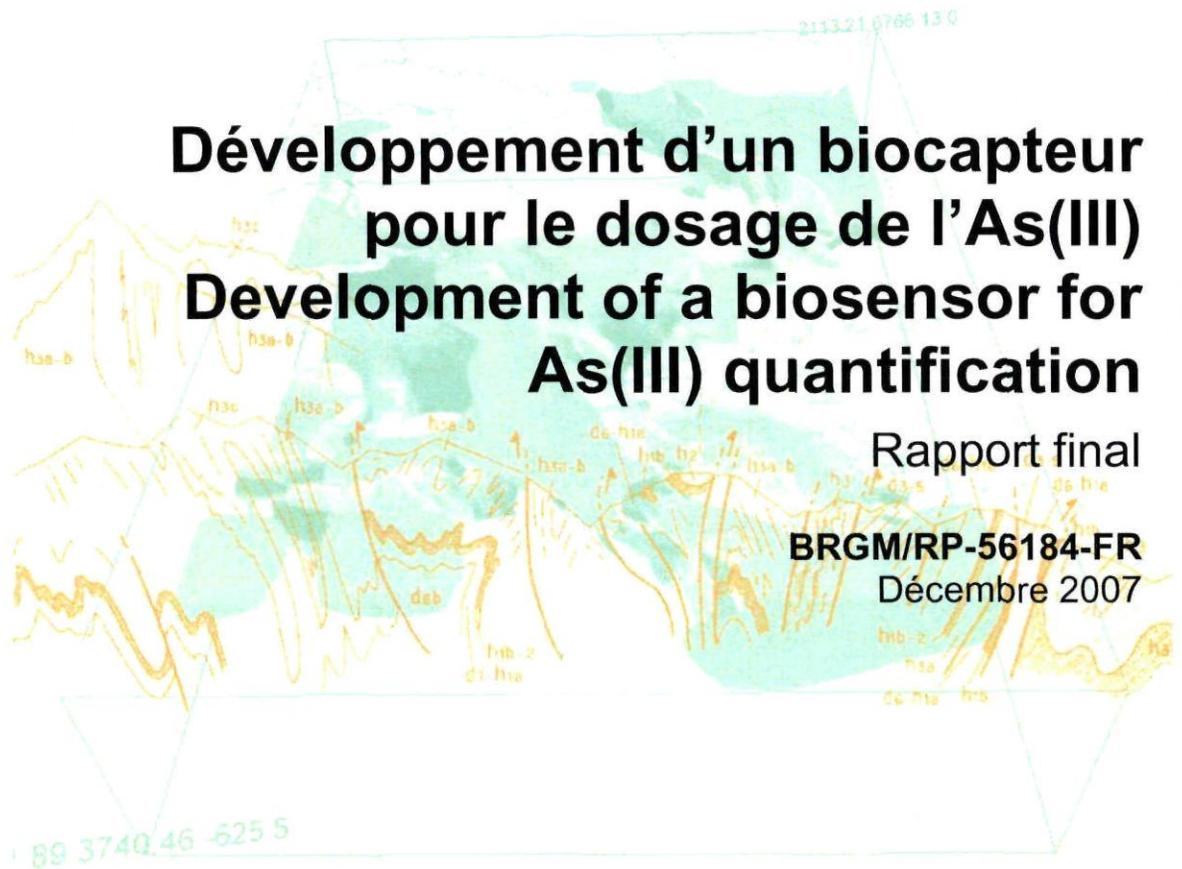




Développement d'un biocapteur pour le dosage de l'As(III) Development of a biosensor for As(III) quantification

Rapport final

BRGM/RP-56184-FR
Décembre 2007



BRGM
Service Environnement & Procédés
Unité Biotechnologies
3, avenue Claude Guillemin
45060 Orléans Cedex 2

Document à accès différé

Etude réalisée dans le cadre du contrat ADEME : 03 72C0050
Date : 23 Décembre 2003
Durée : 4 ans
Responsable ADEME : Cécile GRAND
Responsable des travaux : Caroline MICHEL
Tel : 02 38 64 47 22
Document confidentiel



Développement d'un biocapteur pour le dosage de l'As(III) Development of a biosensor for As(III) quantification

Rapport final

BRGM/RP-56184-FR
Décembre 2007

C. Michel⁽¹⁾, A. Lieutaud^(2,3), B. Schoepp-Cothenet⁽²⁾, F. Battaglia-Brunet⁽¹⁾, M.-C. Lett⁽³⁾, I. Ignatiatis⁽¹⁾, J.-P. Grasa⁽⁴⁾, V. Bonnefoy⁽²⁾

⁽¹⁾BRGM – ⁽²⁾CNRS – ⁽³⁾ULP – ⁽⁴⁾Biosentec

Vérificateur :
Nom : Stéphane ROY
Date : 02/04/08
Signature :
(Ou Original signé par)

Approbateur :
Nom : Hervé Gaboriau
Date : 8/04/08
Signature :
(Ou Original signé par)

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2000.



Mots clés : Biocapteur enzymatique, Arsénite (As(III)), Arsénite-oxydase, Eaux souterraines, Biodisponibilité

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

© BRGM, 2005, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

Le projet Arsenic Sensor, co-financé par l'ADEME pour une durée totale de 4 ans (convention 03 72C0050 du 23 Décembre 2003), a pour objectif de mettre en œuvre l'activité d'oxydation de l'As(III) en As(V) des enzymes arsénite-oxydases pour développer et valider un biocapteur pour le dosage spécifique de l'As(III) dans les eaux souterraines.

Ce projet associe 4 partenaires : l'ULP, chargé de la sélection des enzymes, le CNRS (laboratoires LCB et BIP, Marseille), chargé de la surproduction et de la purification de l'enzyme, le BRGM, chargé de la mise en œuvre du biocapteur et de la coordination, et la société Biosentec, chargée de la pré-industrialisation du biocapteur. La durée de réalisation de l'étude, initialement prévue pour 3 ans à compter du 23 décembre 2003, a été prolongée d'une année. A ce projet a été associée une thèse ADEME/BRGM d'une durée de 4 ans, et soutenue par Mlle Aurélie Lieutaud.

Le présent document est le rapport final de ce projet. Il présente :

- une synthèse « administrative » (contrats signés, rapports, réunions, publications, participations à des congrès, ...) résumant le déroulement du projet sur les 4 ans,
- une synthèse bibliographique sur les biocapteurs à As(III),
- une synthèse des travaux et résultats présentés dans les précédents rapports intermédiaires,
- les travaux réalisés dans la phase 3 du projet.

Les résultats obtenus au cours de ce projet ont fait l'objet d'une publication, et sont présentés dans le manuscrit de Mlle Aurélie Lieutaud qui soutient sa thèse le vendredi 11 janvier 2008 à l'Université de d'Aix-Marseille II (spécialité Microbiologie Moléculaire et Biotechnologies).



Sommaire

2	
1.1.	LES BIOCAPTEURS / RAPPELS.....9
1.1.1.	Généralités9
1.1.2.	Intérêts des biocapteurs dans le domaine environnemental9
1.2.	LES BIOCAPTEURS POUR LE DOSAGE DE L'AS(III)10
1.2.1.	Biocapteurs mettant en œuvre des microorganismes génétiquement modifiés10
1.2.2.	Biocapteurs mettant en œuvre des enzymes12
2.	Synthèse administrative du projet Arsenic Sensor.....15
2.1.	LE CADRE ET LES PHASES DU PROJET ARSENIC SENSOR15
2.2.	DELIVRABLES DU PROJET CHROME SENSOR.....16
2.2.1.	Rapport intermédiaire n°1 (RP-53329-FR, Septembre 2004)16
2.2.2.	Rapport intermédiaire n°2 (RP-53939-FR, Avril 2005)16
2.2.3.	Rapport intermédiaire n°3 (RP-54474-FR, Décembre 2005)16
2.2.4.	Rapport intermédiaire n°4 (RP-55622-FR, Juin 2007)16
2.2.5.	Rapport final (RP- -FR, Décembre 2007)16
2.2.6.	Réunions du projet17
2.2.7.	Publication du projet17
2.2.8.	Congrès17
2.2.9.	Soutenance de la thèse.....18
3.	Synthèse des phases 1 et 2.....19
3.1.	LA PHASE 1 : CHOIX DES ENZYMES ARSENITE-OXYDASES19
3.2.	LA PHASE 2 : EXPRESSION DES ARSENITE-OXYDASES CHEZ UNE BACTERIE HOTE20
3.3.	LE BIOCAPTEUR ET LE PROTOTYPE21
4.	Travaux réalisés dans la phase 3.....23
4.1.	CHOIX DE LA BACTERIE24
4.2.	MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE PURIFICATION25

4.2.1. Localisation de l'enzyme	25
4.2.2. Mise au point de la chromatographie d'échange d'anions	27
* Tamis moléculaire	28
4.3. CARACTERISATION DE L'ENZYME	32
4.3.1. Poids moléculaire de l'enzyme purifiée	32
4.3.2. L'enzyme purifiée est-elle une arsénite oxydase ?	32
4.3.3. Etude de l'activité arsénite oxydase isolée en fonction de la température	34
4.4. ETUDE DU PARTENAIRE PHYSIOLOGIQUE POTENTIEL DE L'ENZYME ...	35
4.4.1. Purification	36
4.4.2. Caractérisation du cytochrome	37
4.4.3. Transfert d'électrons de l'arsénite oxydase vers le cytochrome <i>c₅₅₁/c₅₅₂</i>	39
4.5. ETUDE DE LA SPECIFICITE VIS A VIS DU SUBSTRAT	41
4.5.1. Métabolisme	41
4.5.2. Spécificité	42
4.6. CONCLUSION ET DISCUSSION SUR LES RESULTATS DE LA PHASE 3 ...	43
4.6.1. L'enzyme arsénite oxydase	43
4.6.2. Le partenaire physiologique	44
4.6.3. Du point de vue du biocapteur	45
5. Problèmes rencontrés au cours du projet Arsenic Sensor	46
6. Conclusions	49
7. Bibliographie	51
8. Annexe 1	53

Liste des illustrations

Figure 1 : Gel natif et activité arsénite oxydase des protéines issues de deux modes de casse des cellules bactériennes de *R. solanacearum* str. S22. Pistes 1 et 2 : cellules lysées par du lysozyme. Pistes 3 et 4 : cellules cassées par presse de French. Piste 1 : sphéroplastes. Piste 2 : périplasme. Piste 3 : protéines membranaires. Piste 4 : protéines solubles

26

Figure 2 : Visualisation des protéines après différentes étapes de purification par gel acrylamide 10 % contenant du SDS. Pistes 1 : Marqueur de poids moléculaire. Piste 2 :

échantillon purifié après la colonne DEAE Sephacel. Piste 3 : échantillon purifié après la colonne DEAE MonoQ.	28
Figure 3 : Profil d'élution de l'échantillon contenant l'arsénite oxydase sur tamis moléculaire Superdex S200.....	29
Figure 4 : Visualisation des protéines après le tamis moléculaire par gel acrylamide 10 % contenant du SDS. Pistes 1 et 3 : Marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : échantillon après purification sur la colonne Superdex 200.	
Figure 5 : Spectre RPE du centre [2Fe-2S] de la petite sous-unité de l'arsénite oxydase de <i>R. solanacearum</i> sp. S22 réduite au dithionite.	34
Figure 6 : Séquences nucléotidique et protéique d'une partie de l'arsénite oxydase de la bactérie <i>R. solanacearum</i> str. S22 déterminées par Muller et al. (2004). Souligné : séquence des peptides obtenus par digestion trypsique.	
Figure 7 : Activité arsénite oxydase en fonction de la température. 100 % représente l'activité arsénite oxydase à 60°C.	34
Figure 8 : Détection du cytochrome c_{552} par gel dénaturant. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : cytochrome après purification sur une colonne échangeuse de cations (CM-52) et un tamis moléculaire (Superdex 200). Piste 3 : le même cytochrome détecté par coloration au TMBZ.....	36
Figure 9 : Alignement de la séquence N-terminale du cytochrome de <i>R. solanacearum</i> str. S22 (1) avec ceux de <i>R. eutropha</i> H16 (2) et <i>R. eutropha</i> JMP134 (3). En rouge sont indiqués les résidus identiques.	38
Figure 10 : Révélation des hèmes des cytochromes c (par la méthode TMBZ) de la bactérie <i>R. solanacearum</i> str. S22. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : périplasme provenant de cellules cultivées en présence d'arsénite. Piste 3: fraction soluble totale de bactéries cultivées en absence d'arsénite de sodium. Piste 4 : fraction soluble totale de bactéries cultivées en présence d'arsénite de sodium.	38
Figure 11 : Cinétique du cytochrome dilué dans un tampon MES 50 mM pH 6. Les pics correspondent à l'ajout de l'enzyme et de l'arsénite de sodium (Trait noir) ou de l'arsénite de sodium seul (Trait rouge).....	40
Figure 12 : Cinétique de réduction du cytochrome dilué dans un tampon MES 50 mM pH 6. Les pics correspondent à l'ajout soit : Trait noir : de l'enzyme et l'arsénite de sodium. Trait rouge : de l'arsénite de sodium. Trait bleu : de l'enzyme et le sulfite de sodium. Trait vert : du sulfite de sodium.	
Tableau 1 : Activité totale en fonction du volume de culture cellulaire. Les bactéries ont été cultivées dans 400 ml de milieu en présence de 2 mM d'arsénite de sodium en fin de phase exponentielle. Ces travaux ont été obtenus à Strasbourg et reprennent des valeurs des tableaux 27 et 28	24
Tableau 2 : Activité arsénite oxydase de <i>R. solanacearum</i> str. S22. Les bactéries sont cultivées en présence de 2mM d'arsénite de sodium.....	25
Tableau 3 : Activité arsénite oxydase sur les fractions cellulaires obtenues après casse à différentes pressions (11 000, 14 000, 20 000 PSI) avec la presse de French de cellules de <i>R. solanacearum</i> str. S22 cultivées en présence de 2 mM d'arsénite de sodium. Mesures relatives calculées en pourcentage par rapport à l'activité arsénite oxydase totale	26
Tableau 4 : Concentration protéiques solubles avant et après chauffage à 60 °C pendant 10 min.	27

Tableau 5 : Rendement de purification lors des différentes étapes de la purification. Mesures relatives calculées en pourcentage par rapport à l'activité arsénite oxydase totale. 31

Tableau 6 : Comparaison entre la digestion théorique de la séquence et la liste des masses expérimentales.

Tableau 7 : Comparaison de l'activité arsénite oxydase entre deux accepteurs d'électrons : le cytochrome c_{551}/c_{552} et le DCPIP. 40

Tableau 8 : Comparaison des activités arsénite oxydase et sulfite oxydase de la fraction soluble de la bactérie *R. solanacearum* str. S22 cultivée en absence ou en présence de 2 mM d'arsénite de sodium. 41

Tableau 9 : : Activités arsénite oxydase et sulfite oxydase de l'enzyme partiellement purifiée.

Liste des annexes

Pour que la liste des annexes soit faite en automatique dans le sommaire, insérez vos titres d'annexes au fil de votre rapport comme suit : « insertion » « légende ». La mention « annexe 1 » vous est proposée, puis « annexe 2 » etc. Complétez le titre de votre annexe, puis appliquez le style « annexe » à l'ensemble.

Pour faire votre liste en automatique : « insertion » « tables et index » « tables des illustrations » « **annexe** » « depuis modèle »

Annexe 1 Titre de l'annexe 1**Erreur ! Signet non défini.**
 Annexe 2 Titre de l'annexe 2**Erreur ! Signet non défini.**

1. Biocapteurs et dosage de l'As(III)

Ce chapitre a pour objectif de faire une synthèse bibliographique sur les travaux qui ont été réalisés à ce jour pour le développement de biocapteurs à As(III). Cette synthèse vient compléter la synthèse bibliographique faite sur les biocapteurs à métaux et métalloïdes, et à chromate, dans le cadre du projet Chrome Sensor (convention 0372006, projet cofinancé par l'ADEME).

1.1. LES BIOCAPTEURS / RAPPELS

1.1.1. Généralités

Un biocapteur est un outil analytique composé d'un matériel biologique immobilisé et en contact intime avec un transducteur compatible. Le matériel biologique est responsable de la reconnaissance spécifique de la molécule à doser alors que le transducteur physicochimique a pour rôle de convertir le signal biochimique en un signal électrique quantifiable et amplifié par le système électronique.

La spécificité des enzymes est la raison principale de leur utilisation en biocapteur. Dans la mesure où la plupart des enzymes utilisées dans les capteurs a été isolée de microorganismes, les microorganismes (génétiquement modifiés ou non) eux-mêmes sont de potentiels biocatalyseurs. De plus, dans les microorganismes, les enzymes restent dans leur environnement naturel, ce qui augmente leur stabilité et leur activité. Les membranes cellulaires et les organelles peuvent également être utilisées pour la construction de biocapteurs. La spécificité de liaison entre anticorps et antigène peut être exploitée dans les immunobiocapteurs. Certains biocapteurs font également intervenir de l'ADN dans le cas où la molécule à doser est un intercalant. Pour la détection de très faibles concentrations de substances telles que les médicaments, les toxines ou des explosifs, les capteurs basés sur des récepteurs sont très attractifs.

Parmi les attributs majeurs d'un « bon » biocapteur, on peut citer sa spécificité, sa portabilité (dans la plupart des cas), sa capacité à fonctionner dans des solutions optiquement opaques, sa capacité d'analyse en temps-réel, sa simplicité.

1.1.2. Intérêts des biocapteurs dans le domaine environnemental

Les techniques conventionnelles d'analyse de métaux incluent la spectrométrie d'absorption atomique, l'ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), la spectroscopie UV/visible, et la spectroscopie d'absorption aux rayons X. Ces techniques, bien que hautement respectables en terme de limite de détection,

résolution et incertitude, ont pour désavantages leur coût, la nécessité d'avoir à disposition un personnel qualifié, parfois la non spécificité, et le fait qu'elles soient généralement des techniques de laboratoire et non de terrain. L'utilisation de biocapteurs à métaux lourds pourrait notamment permettre le tri rapide et peu coûteux d'un grand nombre d'échantillons, et de sélectionner ensuite ceux qui nécessitent une analyse supplémentaire par les techniques de laboratoire citées ci-dessus, ce qui diminuerait ainsi le coût des analyses du fait de la diminution du nombre d'échantillons à analyser en laboratoire. Pour ces raisons, les biocapteurs présentent un intérêt pour le suivi des concentrations en métaux lourds. De plus, de part leur composant biologique, les biocapteurs sont un outil idéal pour des mesures toxicologiques, alors que les techniques conventionnelles peuvent seulement mesurer la concentration. En effet, en plus de leur spécificité pour un polluant donné, spécificité qui peut aller jusqu'à la spéciation, et donc donner des informations sur les propriétés du polluant, (mobilité, capacité à interagir avec les cellules ou les composants cellulaires), l'utilisation de biocapteurs permet d'introduire la notion de biodisponibilité directement reliée à la toxicité du polluant dans la mesure où un polluant détectable par un biocapteur est un polluant capable d'interagir avec le vivant.

1.2. LES BIOCAPTEURS POUR LE DOSAGE DE L'AS(III)

Un certain nombre de travaux a été réalisé sur le thème des biocapteurs pour le dosage de l'arsénite. Les travaux présentés ici correspondent à la première phase de la mise en œuvre des biocapteurs, à savoir la sélection du biorécepteur et du transducteur, et les premiers essais montrant la possibilité de doser l'As(III) par le système mis en œuvre. A notre connaissance, ces travaux n'ont pour l'instant pas conduit à des travaux de validation sur le terrain, de prototype, ou de mise sur le marché.

1.2.1. Biocapteurs mettant en œuvre des microorganismes génétiquement modifiés

Les bactéries possèdent des systèmes de résistance aux métaux lourds qui sont souvent spécifiques d'un ou de quelques métaux. Ces systèmes de résistance incluent des systèmes d'efflux des métaux, de séquestration des métaux, ou bien une combinaison de ces mécanismes. Les protéines qui confèrent la résistance aux métaux ou qui sont impliquées dans les systèmes de régulation, de même que les microorganismes génétiquement modifiés possédant des séquences d'ADN codant pour ces mécanismes de résistance, ont été exploités pour le développement de biocapteurs pour le dosage de métaux (Verma and Singh, 2005).

Les microorganismes génétiquement modifiés (bactéries, levures) pour la mise au point de biocapteurs à métaux lourds sont des microorganismes portant un plasmide sur lequel a été inséré un **gène rapporteur** (gène qui va conduire à la synthèse d'une protéine que l'on va pouvoir doser facilement du fait de ses propriétés, telle que la luciférase qui fluoresce) placé sous le contrôle d'un **promoteur** issu d'un système de

résistance bactérien. Le promoteur est responsable de la reconnaissance spécifique des métaux, et n'entraîne l'expression du gène rapporteur placé sous son contrôle qu'en présence du métal que l'on souhaite doser.

Le principe d'utiliser des microorganismes génétiquement modifiés a ainsi été mis en œuvre pour le développement de biocapteurs à arsénite.

Les travaux de Fujimoto et al., (2006) ont par exemple permis la construction d'un plasmide portant la région promoteur du gène *arsR* ainsi que le gène *arsR* de *Escherichia (E.) coli* fusionnés au gène *crtA* qui est responsable de la synthèse des caroténoïdes chez la bactérie photosynthétique *Rhodovulum (R.) sulfidophilum*. En absence d'arsénite, la protéine ArsR se fixe sur la région promoteur et bloque l'expression du gène *arsR* et du gène rapporteur. En présence d'arsénite, la protéine ArsR se lie à l'arsénite ce qui entraîne un changement conformationnel de ArsR qui ne peut plus se fixer sur le promoteur et réprimer l'expression du gène rapporteur. Le plasmide ainsi construit a été inséré dans une souche mutante de *R. sulfidophilum* ne portant pas de gène *crtA*. La culture bactérienne passe ainsi du jaune au rouge en présence d'As(III). Le changement de couleur peut être détecté à l'œil nu dès 5 µg/l d'arsénite. Le temps de réponse (i.e. obtention d'un changement de couleur, est de l'ordre de 12 à 24 heures, ce qui est assez long. Deux interférents au dosage de l'As(III) ont été mis en évidence : le bismuth et l'antimoine qui entraînent l'apparition de la couleur rouge à 60 et 600 µg/l, respectivement. Des métaux tels que le fer, l'aluminium, le cuivre et le manganèse, n'interfèrent pas avec la mesure. La détection de la présence d'arsénite se fait donc à l'œil nu. Ce biocapteur n'est donc pas quantitatif à ce stade de développement.

Un autre exemple est donné par les travaux de Scott et al (1997). Ces auteurs ont mis au point le même type de construction, en fusionnant cette fois-ci la région promoteur du gène *arsR* ainsi que le gène *arsR* au gène rapporteur codant pour la β-galactosidase. Ce système répond sélectivement à l'arsénite et à l'antimoine (et dans une moindre mesure l'arséniate). Aucune interférence significative n'a été observée avec le phosphate, le sulfate, le nitrate, ou le carbonate. Ces travaux montrent, tout comme les travaux de Fujimo et al. (2006) présentés ci-dessus, que le temps de réponse, qui correspond au temps d'induction de la synthèse de l'enzyme codée par le gène rapporteur, est assez long. Scott et al (1997) ont ainsi montré qu'une période d'induction de 17 heures permettait d'améliorer la limite de détection et donc de détecter de plus faibles concentrations en métalloïdes. Pour une concentration donnée, l'intensité du signal augmente avec le temps d'induction.

Toujours basé sur le même principe, Stocker et al. (2003) ont développé un système de bandelettes. La bactérie *E. coli* est génétiquement modifiée comme décrit précédemment, en introduisant un plasmide comportant le gène *arsR* et son promoteur auxquels est associé le gène de la β-galactosidase. Les bactéries sont alors immobilisées par séchage sur une bandelette de papier qui peut être stockée 2 mois à -20, 4 ou 30°C. Pour le dosage, les bandelettes sont incubées 30 minutes à 30°C avec la solution d'arsénite à doser, puis le substrat (X-gal) de l'enzyme (β-galactosidase codée par le gène rapporteur) est ajouté. Le résultat, qui correspond à une coloration de la bandelette en bleu, est visible après 30 minutes d'incubation à 20°C. Cette

technique permet donc une mesure semi-quantitative de l'arsénite. Ces auteurs ont montré que l'utilisation d'autres gènes rapporteurs tels que le gène codant pour la luciférase permet une approche plus quantitative que la technique couplant β -galactosidase /bandelettes de papier, mais nécessite un luminomètre (et non pas l'œil nu) pour la lecture du résultat. La technique des bandelettes semble donc plus appropriée pour une mesure simple sur le terrain (Stocker et al., 2003 ; Schaefer, 2003). Ces travaux ont permis de doser l'arsenic dans des eaux avec des seuils de détection de 8 $\mu\text{g/l}$ avec le système à bandelette de papier, et de 4 $\mu\text{g/l}$ avec le système mettant en œuvre la luciférase. Il faut toutefois noter que l'arséniate en plus de l'arsénite est dosé par ces biocapteurs.

On peut enfin citer les études de Cai et DuBow (1997) qui ont proposé un biocapteur pour lequel le gène de la luciférase est fusionné au gène *arsB* situé sur le chromosome d'une souche de *E. coli* possédant un opéron *arsRBC* dans son génome. On travaille donc ici avec l'ADN génomique, et non pas avec de l'ADN plasmidique.

1.2.2. Biocapteurs mettant en œuvre des enzymes

L'objectif du projet Arsenic Sensor était de mettre au point un biocapteur à enzyme pour le dosage de l'arsénite. Ce type de biocapteur était nouveau dans le domaine des biocapteurs pour le dosage de l'As(III), puisque au démarrage du projet, seuls des biocapteurs à microorganismes génétiquement modifiés avaient été étudiés. Des travaux portant sur l'utilisation d'une arsénite oxydase pour la mise au point d'un biocapteur pour le dosage de l'As(III) viennent toutefois d'être publiés (Male et al., 2007).

Le biocapteur mis au point par ces auteurs fait intervenir l'arsénite-oxydase de la bactérie *Rhizobium* sp. str. NT-26, qui est électrochimiquement immobilisée sur le transducteur. Le transducteur utilisé est une électrode de carbone vitreux avec une surface active constituée de nanotubes de carbone multiparois, ce qui est différent de ce que nous avons envisagé dans le projet Arsenic Sensor (électrode de carbone vitreux). Ce biocapteur permet de doser l'arsénite avec une limite de détection de 1 ppb. Le temps de réponse est très faible puisque le biocapteur réagit dans les 10 secondes. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où avec les biocapteurs à enzyme, l'enzyme est directement en contact avec la molécule à doser, la réaction est donc immédiate, comparée à un biocapteur à microorganismes où la molécule à doser doit d'abord franchir la paroi et la membrane bactérienne pour entrer dans la cellule et interagir avec le biorécepteur. Ce constat avait déjà été fait avec le biocapteur à Cr(VI) développé dans le cadre du projet Chrome Sensor (Michel et al., 2003 et 2006). Dans le cas du biocapteur à As(III)-oxydase mis au point par Male et al. (2007), la quantité d'enzyme utilisée est de 0.19 mg/cm^2 . Le cuivre interfère très légèrement avec le dosage de l'arsénite à des concentrations supérieures à 500 ppb. L'arséniate n'interfère pas (les auteurs ont travaillé avec des concentrations en As(V) allant jusqu'à 1 ppm). Pour information, la purification de l'enzyme a nécessité un réacteur de 7 litres de culture bactérienne.

La publication des résultats de Male et al. (2007) montre l'intérêt de développer un biocapteur à arsénite-oxydase pour le dosage de l'arsénite. Ce type de travail

correspond à ce que nous souhaitons faire dans la phase 4 du projet. Malheureusement, comme cela va être détaillé ci-après, nous n'avons pas pu réaliser la mise au point d'un biocapteur. Les travaux de Male et al. (2007) sont très encourageants mais nécessitent d'être approfondis de manière à tester l'influence de certains paramètres physico-chimiques caractéristiques des eaux pollués à l'As(III), tels que le pH, la force ionique, ... sur la réponse du biocapteur. Des tests sur le terrain sont ensuite nécessaires pour valider la possibilité de développer un biocapteur commercialisable.

2. Synthèse administrative du projet Arsenic Sensor

2.1. LE CADRE ET LES PHASES DU PROJET ARSENIC SENSOR

Le projet Arsenic Sensor a pour objectif de mettre en œuvre l'activité d'oxydation de l'As(III) en As(V) des As(III)-oxydases pour développer et valider un biocapteur pour le dosage spécifique de l'As(III) dans les eaux souterraines.

Le projet Arsenic Sensor est cofinancé par l'ADEME pour une durée totale de 4 ans (convention 0372C0050 du 23 Décembre 2003), et regroupe 4 partenaires : la société BIOSENTEC, le CNRS (laboratoires LCB et BIP) de Marseille, l'Université de Strasbourg (Laboratoire de Microbiologie et Génétique) et le BRGM (Laboratoires EPI/ECO et MMA/MSE). Ce projet est associé à une thèse cofinancée par l'ADEME et le BRGM et qui est préparée par Mlle Aurélie Lieutaud. Pour des raisons qui seront détaillées plus tard, la durée initiale du projet et de la thèse, qui était de 3 ans, a été rallongée d'une année (cf. l'avenant n°2).

Les contrats qui ont été signés entre les partenaires dans le cadre de ce projet sont les suivants :

- Convention ADEME / BRGM / Biosentec N° 0372C0050, signée le 23 décembre 2003
- Accord de confidentialité BRGM / CNRS / ULP / Biosentec, signé le 15 janvier 2004
- Avenant n°1 à la convention N° 0372C0050, signé le 30 novembre 2004
- Groupement RPI BRGM / CNRS / Biosentec (RPI 143) signé le 23 mai 2005.
- Avenant n°2 à la convention N° 0372C0050, signé le 08 novembre 2006.

Le projet initial comportait 6 phases :

- phase 1 : Choix des enzymes arsénite-oxydases
- phase 2 : Expression des arsénite-oxydases chez une bactérie hôte
- phase 3 : Extraction et purification des arsénite-oxydases
- phase 4 : Mise en œuvre des biocapteurs à As(III)
- phase 5 : Validation des biocapteurs à As(III) sur le terrain
- phase 6 : Pré industrialisation des biocapteurs à As(III)

Pour des raisons scientifiques qui seront présentées plus tard, toutes les phases du projet n'ont pu être menées à terme. En effet, seules les phases 1, 2 et 3 ont pu être réalisées. La réalisation de ces 3 phases a été plus longue que prévue, et l'objectif de ces phases (qui était de surproduire de l'enzyme) n'a pas pu être réalisé en sa totalité. Ceci a ainsi nécessité de rallonger la durée du projet et de la thèse de 3 à 4 ans, et n'a pas permis de réaliser les phases 4, 5 et 6.

2.2. DELIVRABLES DU PROJET CHROME SENSOR

2.2.1. Rapport intermédiaire n°1 (RP-53329-FR, Septembre 2004)

Le premier rapport intermédiaire avait pour objectifs d'établir un cahier des charges pour la réalisation du biocapteur à As(III) pour le dosage de l'As(III) dans des eaux souterraines, et de synthétiser les travaux relatifs à la sélection de 3 enzymes potentiellement intéressantes pour une mise en œuvre en biocapteur (enzymes dont l'activité et la stabilité répondaient au cahier des charges). Les travaux scientifiques présentés dans ce rapport correspondent à la réalisation de la phase 1 du projet et à la première année de thèse d'Aurélie Lieutaud.

2.2.2. Rapport intermédiaire n°2 (RP-53939-FR, Avril 2005)

Le rapport n°2 présente la première partie de la phase 2 du projet, à savoir le clonage, l'amplification et le séquençage des gènes codant pour les 3 arsénite-oxydases sélectionnées dans la phase 1 (cf rapport n°1).

2.2.3. Rapport intermédiaire n°3 (RP-54474-FR, Décembre 2005)

Le rapport n°3 présente la suite des travaux de la phase 2 du projet, à savoir la surexpression des gènes chez *E. coli* et un début de caractérisation des protéines surproduites.

2.2.4. Rapport intermédiaire n°4 (RP-55622-FR, Juin 2007)

Le rapport n°4 est une synthèse présentant l'ensemble des travaux de biologie moléculaire (clonage, séquençage, surexpression) visant à cloner les gènes des 3 arsénites oxydases sélectionnées, à surexprimer ces gènes, et à caractériser les protéines surexprimées en terme de présence, activité, composition. Ce rapport présente donc l'ensemble des travaux de la phase 2 du projet.

2.2.5. Rapport final (RP-56184 -FR, Décembre 2007)

Le 5^{ème} rapport du projet (qui est le présent rapport) correspond au rapport final. Ce rapport présente une synthèse bibliographique sur les biocapteurs à arsenic

(publications parues dans ce domaine), ainsi qu'une synthèse globale du déroulement du projet Arsenic Sensor comprenant le détail des travaux de la phase 3 du projet.

2.2.6. Réunions du projet

Les réunions ont eu lieu dans les locaux de l'ADEME à Paris.

La réunion de lancement de projet a eu lieu le 15 janvier 2004. Cinq réunions d'avancement ont suivi, les 16 septembre 2004, 7 juin 2005, 11 janvier 2006, 13 octobre 2006 et 23 mars 2007. La soutenance de la thèse d'Aurélié Lieutaud marquera la clôture du projet Arsenic Sensor. La soutenance est fixée au 11 janvier 2008.

2.2.7. Publication du projet

Les travaux réalisés dans le projet Arsenic Sensor et dans le cadre du travail de thèse d'Aurélié Lieutaud ont fait l'objet d'une publication :

Lieutaud A., Duquesne K., Ratouchniak J., Muller D., Lett M.-C., Bonnefoy V. (2007). Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp. : from the strain isolation to the gene study. Accepté pour publication dans Environmental Microbiology.

2.2.8. Congrès

- Présentations de Posters:

- « Federation of European Microbiological Societies 2006 », juillet 2006. Arsenic oxidation by bacteria isolated from different contaminated sites.

- « Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé (Marseille) », juin 2005. Criblage d'une collection de bactéries oxydant l'arsenic.

- « 2^{ème} Colloque d'Ecologie Microbienne (CEM Obernai) », mai 2005. Criblage d'une collection de bactéries oxydant l'arsenic.

- Communications orales :

- Microbial arsenite oxidation to arsenate. 10th Workshop on Progress in Analytical Methodologies and Trace Metal Speciation (Luxembourg), avril 2005. Lett M.-C., Muller D., Lièvreumont D., Simeonova D., Lieutaud A., Bonnefoy V., Bertin Ph.

2.2.9. Soutenance de la thèse

Aurélie Lieutaud soutiendra sa thèse le 11 janvier 2008. Le jury sera composé des personnes suivantes : M. Erauzo, Mme Lagarde, Mme Bauda, Mme Bonnefoy, Mme Lett, Mme Schoepp-Cothenet, Mme Battaglia-Brunet, et Mme Grand.

Cette thèse (spécialité Microbiologie Moléculaire et Biotechnologies) sera soutenue à l'Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II.

3. Synthèse des phases 1 et 2

Les travaux réalisés au cours de ce projet l'ont principalement été par Mlle Aurélie Lieutaud dans le cadre de sa thèse ADEME/BRGM, et sont détaillés dans son manuscrit de thèse.

Ce chapitre a pour objectif de synthétiser les résultats obtenus et présentés dans les précédents rapports (rapports intermédiaires 1 à 4) et qui concernent les phases 1 et 2 du projet.

3.1. LA PHASE 1 : CHOIX DES ENZYMES ARSENITE-OXYDASES

La **phase 1** du projet (cf rapport d'avancement n°1) a consisté à établir un cahier des charges du biocapteur et à définir ainsi :

- les caractéristiques que doit avoir l'enzyme, en termes de stabilité, de facilité de purification, d'activité, de spécificité...
- la configuration du biocapteur, qui dépendra des résultats obtenus au cours du projet, et qui sera probablement basée sur le principe de prototype décrit pour le projet Chrome Sensor
- les caractéristiques des eaux souterraines polluées à l'As(III).

D'un point de vue expérimental, la première phase du projet a été réalisée à l'Université de Strasbourg, dans l'équipe de Marie-Claire Lett, et a consisté à recenser un grand nombre de souches de bactéries arsénite-oxydantes et à tester ces souches pour leur capacité à oxyder l'As(III). Cette étape a été possible grâce à la collection de bactéries oxydant l'arsénite (environ 60 souches) que possède l'ULP de Strasbourg, et à la contribution du CNRS de Marseille et du BRGM. Parmi la collection de souches ainsi établie, celles qui possèdent une activité arsénite-oxydase forte ont été choisies pour tester l'influence du pH et de la température sur l'activité enzymatique.

Trois bactéries caractérisées par une activité arsénite-oxydase forte et stable pour différentes conditions environnementales (pH et température) ont ainsi pu être sélectionnées. Il s'agit de *Thiomonas sp*, isolée par le laboratoire du CNRS de Marseille, de la bactérie *Herminiimonas (H.) arsenicoxydans* (précédemment *Cenibacterium arsenoxidans*) isolée par le laboratoire de Strasbourg et de la bactérie

Ralstonia (R.) solanacearum également isolée par ce laboratoire. Ces 3 bactéries proviennent d'origines géographiques différentes : une mine dans le Gard pour *Thiomonas sp*, une station d'épuration en Allemagne pour *H. arsenicoxydans*, une ancienne mine d'or dans le département de l'Aude pour *R. solanacearum*.

Les activités arsénite-oxydase de ces souches se sont révélées stables pour des températures allant de 10 à 30°C, et pour des pH compris entre 6 et 7. Pour des pH supérieurs ou inférieurs à cette gamme, l'activité est plus faible mais toujours présente. Les activités enzymatiques sélectionnées correspondent donc, en ce qui concerne le pH et la température, au cahier des charges du biocapteur enzymatique à As(III) pour le dosage de l'As(III) dans les eaux souterraines. Par contre, ces enzymes ont un taux d'expression faible. Dans la mesure où le développement d'un biocapteur (mise au point au laboratoire, essais sur site, essai en prototype) nécessite une quantité d'enzyme assez importante, il est nécessaire de disposer d'un système de surproduction de l'enzyme de manière à pouvoir purifier une grande quantité d'enzyme à partir d'un volume de culture cellulaire relativement faible. Ce travail, mettant en jeu des techniques de biologie moléculaire, a fait l'objet de la phase 2 du projet Arsenic Sensor. Cette phase a été réalisée au sein de l'équipe de Violaine Bonnefoy du Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB) du CNRS de Marseille.

3.2. LA PHASE 2 : EXPRESSION DES ARSENITE-OXYDASES CHEZ UNE BACTERIE HOTE

L'objectif de la **phase 2** du projet Arsenic Sensor a été de surexprimer, chez une bactérie hôte, les gènes codant pour les arsénite-oxydases préalablement sélectionnées dans la phase 1. Cette phase a été réalisée au laboratoire LCB du CNRS de Marseille, dans l'équipe de Violaine Bonnefoy. Ce travail a ainsi permis :

- de modifier les gènes codant pour les enzymes d'intérêt. Ainsi, il a été possible d'associer une queue Histidine à la séquence de la protéine, afin de purifier ensuite la protéine recombinante en une seule étape de purification (chromatographie d'affinité pour les histidines),
- de surproduire la protéine recombinante de manière à obtenir la protéine d'intérêt en quantité importante.

Ce travail a fait intervenir différentes techniques de biologie moléculaire :

- séquençage des gènes sélectionnés
- modification, amplification et clonage des gènes dans un vecteur
- transformation des bactéries hôtes avec le vecteur

- croissance des bactéries hôtes en présence d'un inducteur permettant la surproduction de la protéine d'intérêt
- purification de la protéine recombinante et tests permettant de vérifier que la protéine recombinante est correctement repliée et active.

Le travail de la phase 2 a donc eu pour objet le clonage et l'expression des gènes codant pour l'arsénite oxydase de *H. arsenicoxydans*, *Thiomonas* sp. et *R. solanacearum* dans la bactérie hôte *E. coli*. Il a été question ici de cloner soit le gène codant pour la sous-unité portant le site catalytique de l'arsénite oxydase (*aoxB*), soit les deux gènes codant pour l'enzyme arsénite oxydase (*aoxA* et *aoxB*) dans un vecteur d'expression. Ceci a été effectué par amplification par PCR du fragment d'ADN d'intérêt. Ce fragment a ensuite été inséré dans un plasmide d'expression. Le plasmide recombinant a été introduit dans une bactérie hôte, *E. coli*. La bactérie contenant le plasmide recombinant a été cultivée dans un milieu de culture permettant un rendement de croissance élevé. Les conditions d'induction du promoteur sous la dépendance duquel a été placé le gène *aoxB* ou les gènes *aoxAB* ont été étudiées pour obtenir une surproduction optimale de la protéine d'intérêt. Les protéines recombinantes ont ensuite été analysées.

Malheureusement, les essais de purification ont montré la propriété de la protéine surproduite à former des corps d'inclusion (agrégation d'enzymes). La formation des corps d'inclusion est due au fait que les centres Fer-Soufre ne sont pas intégrés dans la protéine recombinante.

La solution envisagée pour éviter la formation des corps d'inclusion a été de réduire la vitesse de synthèse de la protéine par diminution de la vitesse de croissance de la bactérie (diminution de la température de croissance par exemple) ou par diminution du taux d'induction de la synthèse de l'enzyme (diminution de la quantité d'inducteur ie d'IPTG). Cette solution n'a pas permis l'obtention d'une enzyme active. La construction génétique réalisée ne permet donc pas de surproduire et de purifier une enzyme recombinante active et soluble. Pour cette raison, il a été décidé de passer à la phase 3 du projet, et de purifier une enzyme native (et non une enzyme recombinante comme initialement prévu). Ceci ne permettra pas d'obtenir la grande quantité d'enzyme nécessaire à la mise au point d'un biocapteur, mais devrait permettre d'avoir assez de protéine pour une étude de caractérisation de l'enzyme, et pour des premiers essais en biocapteur.

3.3. LE BIOCAPTEUR ET LE PROTOTYPE

Le projet Arsenic Sensor a débuté en même temps que le projet Chrome Sensor (convention 0372006). Chrome Sensor a cependant débuté à un niveau plus avancé dans la mesure où la protéine servant de biorécepteur avait déjà été sélectionnée et où des essais en biocapteur avait déjà été réalisés pour valider la possibilité d'utiliser le biorécepteur sélectionné (i.e. le cytochrome c_3) pour la mise au point d'un biocapteur à

chromate (Michel et al., 2003). De plus, le projet Chrome Sensor a permis de soulever certains problèmes liés aux caractéristiques de eaux souterraines (Michel et al., 2006). Le projet Chrome Sensor a enfin permis d'avancer sur la mise au point d'un prototype qui a été détaillé dans le rapport RP-54153-FR (rapport intermédiaire n° 3 de Chrome Sensor). L'objectif d'Arsenic Sensor était donc de tenir compte de l'expérience acquise dans le projet Chrome Sensor pour les phases 4 (Mise en œuvre des biocapteurs à As(III)), 5 (Validation des biocapteurs à As(III) sur le terrain), et 6 (Pré-industrialisation des biocapteurs à As(III)). Les problèmes rencontrés dans les phases 1 à 3 n'ayant pas permis de produire suffisamment d'enzyme, les phases d'essais en biocapteur n'ont pas pu être réalisées.

4. Travaux réalisés dans la phase 3

Les travaux de la phase 3 du projet, intitulée « Extraction et purification des arsénite-oxydases », ont été réalisés au laboratoire BIP du CNRS, sous la direction de Barbara Schoepp-Cothenet, et concernent la purification de l'arsénite oxydase de la souche *Ralstonia* S22, souche sélectionnée lors de la phase 1 du projet. Les travaux ci-dessous reprennent en grande partie les travaux présentés dans le manuscrit de thèse d'Aurélié Lieutaud.

Les travaux de cette phase ont consisté à :

- établir un protocole de purification de l'enzyme. Le protocole mis au point permet d'obtenir une enzyme pure qui a pu être caractérisée. Ces travaux de purification à partir de la souche sauvage ont mis en évidence que le rendement final de purification (22%) est tout à fait honorable en comparaison des autres systèmes caractérisés (50% pour *A. faecalis*, et 15% pour les souches NT-14 et NT-26). En revanche c'est le taux d'expression de l'enzyme qui est sans rapport avec celui des autres systèmes. Nous avons donc dernièrement adopté des conditions de culture plus favorables (5 mM d'As(III)) afin d'augmenter l'induction de la synthèse de l'enzyme. Les étapes de purification ont été mises au point en suivant l'activité d'oxydation de l'As(III) des différentes fractions obtenues au cours de la purification.

- caractériser l'enzyme purifiée sur la base de son activité d'oxydation de l'As(III)) afin de déterminer les caractéristiques suivantes: poids moléculaire (120 KDa apparent, ce qui est légèrement supérieur au poids moléculaire de l'arsénite-oxydase purifiée de NT-26 passée sur tamis par le BIP, mais, qui est en total accord avec le poids des sous-unités (cf plus loin)), sensibilité de l'activité vis-à-vis de la température (l'enzyme est thermostable), caractérisation en RPE (recherche de signaux caractéristiques), partenaire potentiel (cytochrome appartenant à l'opéron *sox* de *Ralstonia eutropha* H16 (sulfite oxydase)), conditions d'expression de l'enzyme (l'activité arsénite-oxydase est induite lorsqu'on cultive la souche en présence d'arsénite).

La purification d'une arsénite-oxydase native n'a pas été envisagée en premier lieu car elle nécessite l'utilisation d'arsénite en grandes quantités pour la culture des bactéries. La manipulation de grands volumes de solutions d'arsénite et arséniate posent des problèmes d'hygiène et de sécurité au CNRS. De plus, cette méthode est plus onéreuse pour obtenir une grande quantité d'enzyme purifiée car les bactéries qui oxydent l'arsénite ont un faible rendement cellulaire. Cependant en attendant la mise au point de la nouvelle stratégie de clonage, ce travail permettait d'aborder deux questions: la première était l'étude de la faisabilité du biocapteur, la seconde était l'étude de l'arsénite oxydase native. En effet, bien que cette enzyme ait été cristallisée, peu de choses sont connues sur son fonctionnement (affinité pour différents substrats,

transferts électroniques internes). Cette connaissance théorique est indispensable au développement d'un projet appliqué.

4.1. CHOIX DE LA BACTERIE

Suite aux résultats obtenus dans la phase 1 du projet, les bactéries sélectionnées pour obtenir des protéines recombinantes de l'arsénite oxydase étaient : *Thiomonas* sp. isolée par le Laboratoire de Chimie Bactérienne (Marseille), *H. arsenicoxydans* et *R. solanacearum* str. S22 isolées par le Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie (Strasbourg) dans deux zones géographiques différentes.

Bactéries	DO _{600nm} finale	Quantité de protéines totales (mg dans l'extrait brut)	Activité (μmol de DCPIP réduit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines totales)	Activité totale (μmol de DCPIP réduit. min^{-1})
<i>Thiomonas</i> sp.	0,45	2,06	216.10^{-3}	434.10^{-3}
<i>H. arsenicoxydans</i>	1,3	5,8	71.10^{-3}	411.10^{-3}
<i>R. solanacearum</i> str. S22	1,2	5,36	176.10^{-3}	943.10^{-3}

Tableau 1 : Activité totale en fonction du volume de culture cellulaire. Les bactéries ont été cultivées dans 400 ml de milieu en présence de 2 mM d'arsénite de sodium en fin de phase exponentielle. Ces travaux ont été obtenus à Strasbourg.

La bactérie *Thiomonas* sp. a une faible densité cellulaire en fin de phase exponentielle en comparaison avec les deux autres bactéries sélectionnées (tableau 1). De plus, cette bactérie pose des problèmes de culture liés à de nombreuses contaminations récurrentes. Cette bactérie n'a donc pas été retenue malgré son activité arsénite oxydase constante aux différents pH et températures testés (cf rapports intermédiaires) et son taux élevé d'activité par milligramme de protéines dans l'extrait brut. La bactérie *H. arsenicoxydans*, malgré un rendement cellulaire plus important que celui de *Thiomonas* sp., n'a pas non plus été sélectionnée car cette bactérie a une activité arsénite oxydase par mg de protéines brutes plus faible que la bactérie *R. solanacearum* str. S22. La bactérie *R. solanacearum* str. S22 a donc été choisie pour la purification de l'enzyme arsénite oxydase. Cette bactérie représente le meilleur compromis (exprimé par l'activité totale d'un extrait brut) avec une bonne production de biomasse alliée à une bonne activité par milligramme de protéines. La séquence de l'enzyme arsénite oxydase de cette bactérie n'est cependant pas entièrement connue.

4.2. MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE PURIFICATION

Après avoir cultivé les bactéries jusqu'en fin de phase exponentielle en présence de 2 mM d'arsénite de sodium dans un premier temps, puis 5 mM d'As(III) ensuite afin d'avoir un meilleur taux d'expression de l'enzyme, les cellules sont récoltées et cassées à la presse de French. Ce mode de casse (voir ci-dessous le paragraphe « Localisation de l'enzyme ») permet de récupérer l'enzyme dans la phase soluble. La méthode mise au point pour la purification de l'enzyme s'inspire du protocole décrit par Anderson *et al.* (1992) et allie chromatographies d'échanges d'ions et tamis moléculaire.

4.2.1. Localisation de l'enzyme

Afin de mettre au point la purification de l'enzyme pour la création du biocapteur, il était nécessaire de connaître la localisation de la protéine. Selon les auteurs considérés, la protéine arsénite oxydase est soit membranaire soit périplasmique. Il a été démontré que l'enzyme est associée à la membrane pour *Alcaligenes. (A.) faecalis* (Anderson *et al.*, 1992), *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2003) et *Thiomonas* sp. (cf article Aurélie Lieutaud). Par contre, elle est périplasmique chez NT-26 (Santini et vanden Hoven, 2004) et NT-14 (vanden Hoven et Santini, 2004). Cet ancrage à la membrane, s'il existe dans notre bactérie, peut poser des problèmes lors de la purification de l'enzyme et lors de la création du biocapteur. Après un cassage des cellules à la presse de French, l'activité enzymatique de chaque fraction subcellulaire est dosée par spectrophotométrie avec du DCPIP comme accepteur terminal d'électrons (tableau 2).

	Protéines membranaires	Protéines solubles
Activité arsénite oxydase	7%	93%

Tableau 2 : Activité arsénite oxydase de *R. solanacearum* str. S22. Les bactéries sont cultivées en présence de 2mM d'arsénite de sodium.

Grâce à ces résultats, et à l'erreur de mesure près, nous pouvons dire que l'enzyme se retrouve à plus de 90 % dans la partie soluble (protéines solubles du cytoplasme et du périplasma). Le segment transmembranaire, s'il existe chez notre bactérie, a donc été clivé durant l'étape de casse à la presse de French. Nous avons voulu tester si la rupture de ce segment transmembranaire était due aux conditions drastiques de casse des cellules bactériennes à la presse de French. Pour cela, des échantillons de bactéries ont été cassés à différentes pressions (tableau 3).

Pression (PSI)	Protéines solubles (%)	Protéines membranaires
----------------	------------------------	------------------------

		(%)
11 000	96	4
14 000	91	9
20 000	95	5

Tableau 3 : Activité arsénite oxydase sur les fractions cellulaires obtenues après casse à différentes pressions (11 000, 14 000, 20 000 PSI) avec la presse de French de cellules de *R. solanacearum* str. S22 cultivées en présence de 2 mM d'arsénite de sodium. Mesures relatives calculées en pourcentage par rapport à l'activité arsénite oxydase totale

La majorité de l'activité arsénite oxydase se trouve donc dans la fraction des protéines solubles (tableau 3), à faible pression comme à forte pression.

Un autre type de fractionnement cellulaire a été testé : la formation de sphéroplastes (bactéries ayant perdu sa paroi, ce qui entraîne une fuite du périplasme hors de la cellule). Après obtention des sphéroplastes, les protéines de chaque fraction sont récupérées et déposées sur un gel natif, et l'activité arsénite oxydase est révélée. Les résultats sont présentés sur la figure 1.



Figure 1 : Gel natif et activité arsénite oxydase des protéines issues de deux modes de casse des cellules bactériennes de *R. solanacearum* str. S22. Pistes 1 et 2 : cellules lysées par du lysozyme. Pistes 3 et 4 : cellules cassées par presse de French. Piste 1 : sphéroplastes. Piste 2 : périplasme. Piste 3 : protéines membranaires. Piste 4 : protéines solubles.

Les résultats des pistes 3 et 4 confirment les résultats obtenus sur *A. faecalis* et *H. arsenicoxydans*: l'arsénite oxydase obtenue après une casse des cellules à la presse de French est majoritairement soluble. Par contre, l'activité est retrouvée majoritairement dans les sphéroplastes après action du lysozyme (piste 1). Ce résultat

montre que l'arsénite oxydase de *R. solanacearum* str. S22 a un segment transmembranaire (membrane interne) et que cette association à la membrane est fragile. La casse des cellules par presse de French présente un avantage qui sera exploité pour la mise au point de la purification de l'enzyme. En effet une telle casse permet de travailler sur une protéine soluble sans utilisation de détergent. L'obtention d'une telle protéine répond parfaitement au cahier des charges défini pour la création du biocapteur.

4.2.2. Mise au point de la chromatographie d'échange d'anions

* DEAE Sephacel

La première colonne utilisée pour la purification de l'enzyme par Anderson *et al.* (1992) est une colonne échangeuse d'anions de type DEAE (DiEtylAminoEthyl). La séquence de l'enzyme de notre bactérie n'étant pas déterminée, le point isoélectrique (pI) est inconnu.

Nous avons donc déterminé par des essais successifs un pH pas trop extrême auquel la protéine adhère à une colonne échangeuse d'ions. Une chromatographie à pH de 8 sur DEAE s'est avérée compatible avec l'adhésion de l'enzyme sur ce type de support. Nous avons testé alors différents types de supports DEAE afin d'optimiser cette première étape. Trois colonnes différentes ont été testées : une DEAE BiogelA, une DEAE 52 et une DEAE Sephacel. Le support DEAE Sephacel a un rendement 10 % supérieur à celui des deux autres colonnes DEAE et une meilleure sélectivité, c'est donc ce support qui a été choisi pour la suite des expériences.

La colonne DEAE Sephacel a été équilibrée dans un tampon Tricine 50 mM à pH 8. L'enzyme a été éluée à 50 mM de NaCl. Cet échantillon (Figure 2) a été concentré, dialysé pour éliminer le sel présent dans l'échantillon.

Lors des différents essais de purification, nous avons chauffé jusqu'à 10 min à 60°C l'échantillon contenant les protéines solubles avant de l'injecter sur la colonne DEAE Sephacel. Grâce à cette étape de chauffage, nous avons éliminé de nombreuses protéines contaminantes (Tableau 4), tout en gardant intacte l'activité de l'enzyme. L'enzyme s'avère donc thermorésistante. Nous avons fait par la suite une étude détaillée de cette thermostabilité.

	Avant chauffage	Après chauffage
Concentration protéique soluble (mg.ml ⁻¹)	3,2	1,016
Activité arsénite oxydase (µmol de DCPIP réduit.min ⁻¹ .mg ⁻¹ de protéines totales)	5,9.10 ⁻³	18,2.10 ⁻³

Tableau 4 : Concentration protéiques solubles avant et après chauffage à 60 °C pendant 5 min, (à 10 min l'enzyme commence elle aussi à être atteinte).

* DEAE MonoQ

Une seconde étape de purification sur une colonne MonoQ (Amersham Pharmacia Biotech) en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) a été testée. La colonne MonoQ est aussi une colonne échangeuse d'anions, mais est plus résolutive. Cette deuxième colonne, d'où l'arsénite oxydase est éluée à environ 30 mM de sel lors d'un gradient de 0 à 100 mM, a permis de mieux séparer la protéine arsénite oxydase des autres protéines présentes (Figure 2).

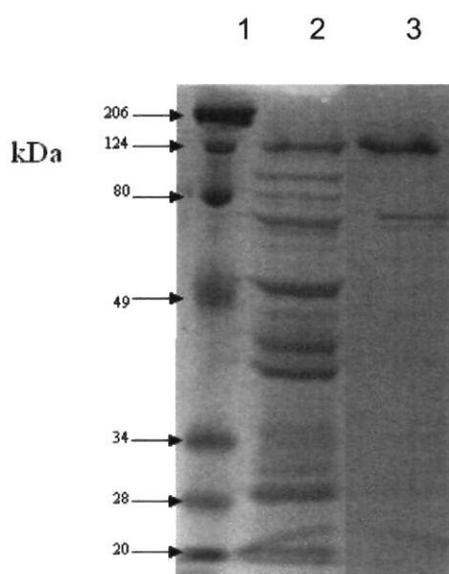


Figure 2 : Visualisation des protéines après différentes étapes de purification par gel acrylamide 10 % contenant du SDS. Pistes 1 : Marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : échantillon purifié après la colonne DEAE Sephacel. Piste 3 : échantillon purifié après la colonne DEAE MonoQ.

* Tamis moléculaire

Afin d'atteindre la pureté de l'enzyme, nous avons introduit une étape de chromatographie sur tamis moléculaire. Deux tamis différents ont été utilisés à cette étape : Superose 6 et la Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech). La Superdex 200 a une meilleure résolution, et a donc été sélectionnée pour cette étape de purification. L'échantillon obtenu après la colonne MonoQ a été concentré, et injecté sur une colonne Superdex 200 connectée à une HPLC. Cette colonne est équilibrée avec du tampon Tricine 50 mM pH 8 contenant 100 mM de NaCl. Le profil d'éluion de l'échantillon est présenté dans la figure 3. La protéine d'intérêt est éluée lors du premier pic.

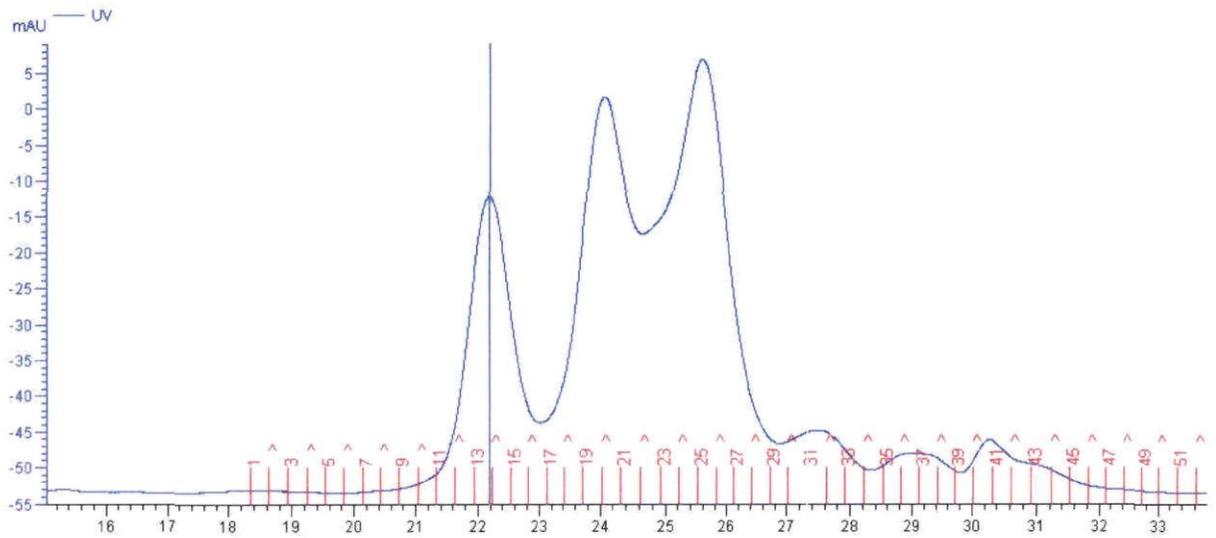


Figure 3 : Profil d'élution de l'échantillon contenant l'arsénite oxydase sur tamis moléculaire Superdex S200.

Afin de vérifier le degré de pureté de l'enzyme ainsi obtenue nous avons effectué une électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (Figure 4).

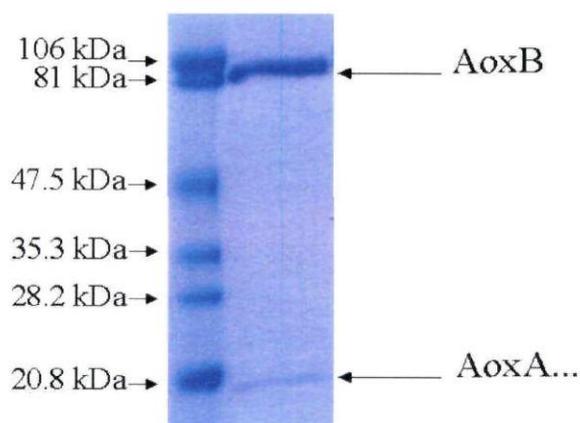


Figure 4 : Visualisation des protéines après le tamis moléculaire par gel acrylamide 5-15% qui permet une meilleure résolution des grands et petits poids moléculaires. Piste de gauche: Marqueur de poids moléculaire. Piste de droite: échantillon après purification sur la colonne Superdex 200.

Nous pouvons constater que l'enzyme ne présente que deux bandes visibles. La plus grosse bande de poids moléculaire apparent de 90 kDa a été séquencée et identifiée (MSAPKDRITLPPK en maldi et digestion trypsique) sans ambiguïté comme étant la sous-unité AoxB de l'arsénite oxydase. Le séquençage de la petite sous-unité (déterminée à 14896 Da en MS), malgré plusieurs essais, montrait l'existence étonnante de contaminant après transfert sur membrane PVDF, empêchant ainsi la détermination de la séquence N-terminale de la sous-unité. Nous avons tenté une autre approche qui a consisté à traiter l'enzyme "pure" par 2M d'urée et séparation des différents éléments sur tamis moléculaire. Nous avons alors révélé qu'un cytochrome (cf plus loin), probablement le transporteur électronique interagissant avec l'enzyme, "polluait" la préparation (ce qui suggère une affinité forte avec l'enzyme). Ce cytochrome (cf plus loin) ayant une masse apparente très proche de AoxA, il migre avec AoxA sur gel d'acrylamide. Nous sommes actuellement en train de mettre au point un type de préparation (à base de traitement urée) de l'échantillon afin de parvenir à la détermination de cette séquence. Si on fait la somme des poids moléculaires des 2 sous-unités (90+14), on arrive à une masse globale tout à fait normale pour une arsénite-oxydase. Si on rajoute environ 10 kDa pour le cytochrome

qui lui reste attaché, on peut ainsi expliquer que la masse globale précédemment obtenue en tamis moléculaire était un peu trop grande.

A la fin de cette étape de purification, nous pouvons faire le bilan des différentes étapes de purification (Tableau 36). Le rendement est de 22 % à la fin de l'expérience.

	Pourcentage (%)	Taux de purification
Protéines solubles totales chauffées	100	1
Chauffe 5 min à 60°C	95	3
Colonne DEAE Sephacel	65	12.86
Colonne MonoQ	48	264.3
Colonne Superdex 200	22	318.6

Tableau 5 : Rendement de purification lors des différentes étapes de la purification. Mesures relatives calculées en pourcentage par rapport à l'activité arsénite oxydase totale.

4.3. CARACTERISATION DE L'ENZYME

4.3.1. Poids moléculaire de l'enzyme purifiée

Comme nous venons de le voir, les résultats suggèrent que l'enzyme est constituée d'une grande sous-unité AoxB de 90 kDa et d'une petite sous-unité AoxA de 14 kDa.

La séquence N-terminale de la protéine a été déterminée. Ce séquençage a déterminé 13 résidus MSAPKDRITLPPK qui identifient sans ambiguïté (par homologie avec les autres AoxB connues) l'AoxB. Pour AoxA, comme précisé précédemment, il n'a pas été possible de séquencer cette sous-unité du fait de la présence de contaminant (le cytochrome c).

4.3.2. Signaux RPE de l'enzyme isolée

Après la purification de l'enzyme, nous avons voulu rechercher par RPE les spectres caractéristiques du centre [3Fe-4S] de la grande sous-unité de l'arsénite oxydase, et celui du centre [2Fe-2S] de type Rieske de la petite sous-unité. Nous n'avons pu observer le signal du centre [3Fe-4S] de la grande sous-unité AoxB de l'arsénite oxydase que dans un seul des essais mais nous avons bien observé le signal [2Fe-2S] de la petite sous-unité de l'arsénite oxydase (Figure 5). La raison pour laquelle le signal [3Fe-4S] est visible (voir plus bas) de façon aléatoire est encore inconnue et nous y travaillons actuellement. L'hypothèse première n'est en tous les cas pas que le centre est détruit vu l'activité tout à fait normale de l'enzyme.

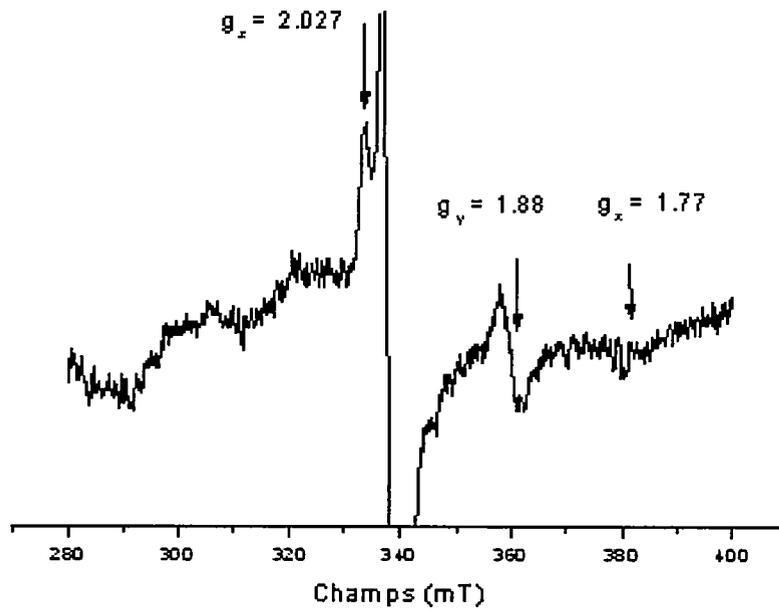
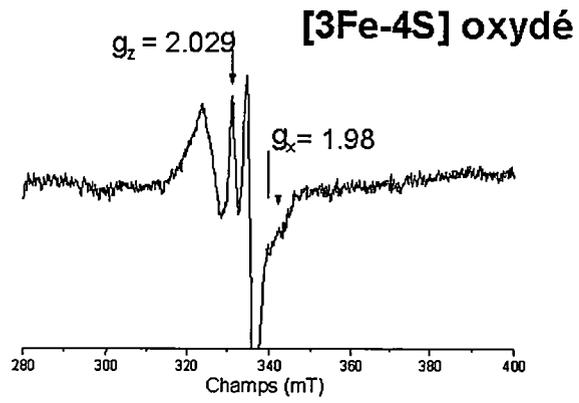


Figure 5 : Spectre RPE du centre [2Fe-2S] de la petite sous-unité de l'arsénite oxydase de *R. solanacearum* sp. S22 réduite au dithionite.

4.3.3. Etude de l'activité arsénite oxydase isolée en fonction de la température

Nous avons testé l'activité arsénite oxydase de l'enzyme à diverses températures. Les températures testées varient de 10 à 60°C, cette gamme de température est plus étendue que pour la mesure des activités arsénite oxydase sur extraits bruts (cf résultats de la phase 1) car cette expérience ne répond pas ici seulement à un critère strict de la mise au point du biocapteur mais à un travail plus vaste de caractérisation de l'enzyme (Figure 6).

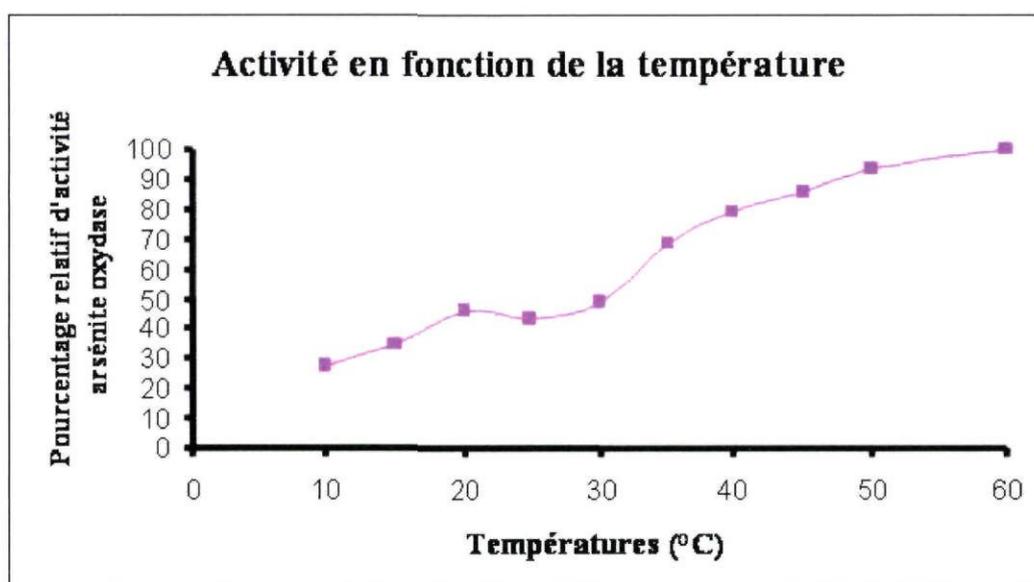


Figure 6 : Activité arsénite oxydase en fonction de la température. 100 % représente l'activité arsénite oxydase à 60°C.

Nous pouvons voir que, l'activité augmente avec la température pour atteindre son maximum à 60°C (température au delà de laquelle il ne nous a pas été possible de tester l'activité pour une raison technique). L'activité est plus de trois fois plus importante à 60°C qu'à 10°C. Le début de cette courbe d'activité en fonction de la température retrace parfaitement les résultats obtenus auparavant avec les extraits bruts (cf résultats obtenus dans la phase 1). Cette dernière caractéristique est intéressante pour la création du biocapteur. Le phénomène de thermostabilité de l'arsénite oxydase, bien que mise en pratique dans un protocole (Anderson *et al.*, 1992) n'a jamais été étudié en détail.

-Cette courbe résulte d'une conjonction de deux phénomènes bien connus en enzymologie: l'activation universelle due à la température sur toute réaction chimique (enzymatique ou non), et la thermorésistance de l'enzyme. Cette dernière propriété est variable selon les enzymes et définira à elle seule le maximum de la courbe présentée en figure 6. Toute enzyme sera plus active à haute température mais certaines mourront avant de l'avoir montré! Une étude de la thermorésistance de l'enzyme étudiée est présentée en figure 7.

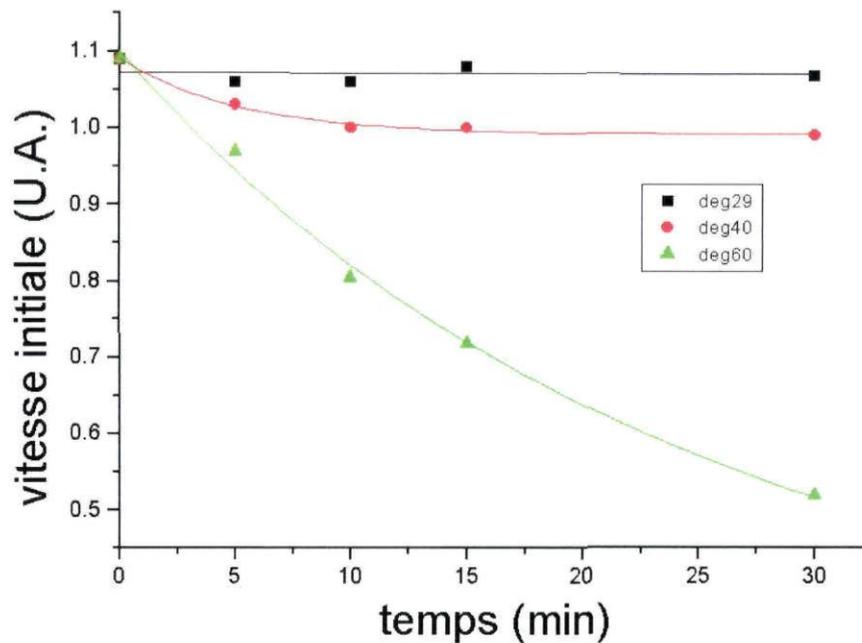


Figure 7 : étude de la thermorésistance de l'activité l'enzyme purifiée. Le temps définit le temps de chauffage à 25, 40 ou 60 °C. L'activité restante est ensuite mesurée normalement à température normale.

4.4. ETUDE DU PARTENAIRE PHYSIOLOGIQUE POTENTIEL DE L'ENZYME

Lors de la purification de l'enzyme, nous avons remarqué que la fraction non retenue (première étape de lavage) sur la DEAE Sephacel présentait une quantité particulièrement importante de cytochrome. Or, il a été démontré par les équipes de Muller *et al.* (2003), Kashyap *et al.* (2006), Santini *et al.* (2007) et Slyemi *et al.* (2007) qu'il existe un gène codant pour un cytochrome *c* dans l'opéron codant pour l'arsénite

oxydase de différentes bactéries. Après de rapides tests d'activité, nous avons constaté que le cytochrome dominant contenu dans la fraction non retenue sur DEAE était réduit en présence de l'enzyme purifiée et d'arsénite. Nous avons donc voulu caractériser davantage ce cytochrome.

4.4.1. Purification

Pour cela, lors de la première étape de purification de l'arsénite oxydase, nous avons récupéré le lavage de la colonne DEAE Sephacel après injection de l'échantillon contenant l'enzyme. Cet échantillon a été injecté sur une colonne échangeuse de cations CM-52, équilibrée dans un tampon Tricine 50 mM pH 8. Le cytochrome est thermostable lui aussi car il est toujours présent après chauffage à 60°C pendant 5 minutes des protéines solubles totales, mais cette étape de chauffage le réduit, nous avons donc systématiquement oxydé la fraction au ferricyanure. Ainsi oxydé et seulement ainsi, il s'adsorbe sur le support CM et est élué à 50 mM de NaCl. Une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire a été ensuite réalisée par un tamis moléculaire sur une colonne Superdex 75 connectée à une HPLC. L'échantillon obtenu est analysé sur un gel dénaturant (Figure 8), ce même cytochrome est détecté par coloration au TMBZ (Figure 8 piste 3). Son poids moléculaire apparent est de 9,2 kDa. Le poids moléculaire déterminé en spectroscopie de masse est de 9,9 kDa.

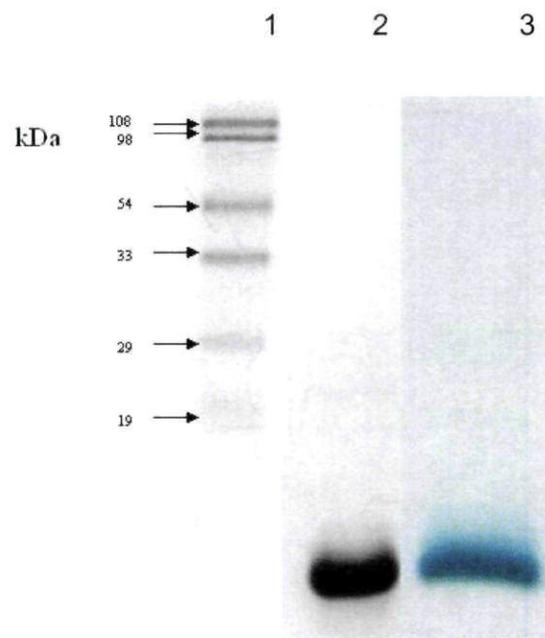


Figure 8 : Détection du cytochrome c_{552} par gel dénaturant. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : cytochrome après purification sur une colonne échangeuse de cations (CM-52) et un tamis moléculaire (Superdex 200). Piste 3 : le même cytochrome détecté par coloration au TMBZ.

4.4.2. Caractérisation du cytochrome

Le potentiel d'oxydoréduction de ce cytochrome a été déterminé à 230 ± 10 mV par un titrage potentiométrique. Il présente une bande α d'absorption à l'état réduit à 552,2 nm. Le cytochrome que l'on retrouve dans cet échantillon a donc des caractéristiques proches du cytochrome purifié par Santini *et al.* (2007). Ce cytochrome pourrait être le partenaire physiologique de l'arsénite oxydase de *R. solanacearum* str. S22.

La séquence N-terminale de ce cytochrome *c* a été déterminée et comparée aux banques de séquences connues. Cette séquence présente un fort pourcentage d'identité (79 %) avec un cytochrome c_{551}/c_{552} de l'opéron de la sulfite oxydase (opéron *sox*) des bactéries *R. eutropha* H16 (NC_008313) et *R. eutropha* JMP134 (NC_007347) (Figure 9). Aucun gène codant pour l'arsénite oxydase n'a cependant été retrouvé dans la séquence du génome de ces deux organismes.

```

1-      KAQQIAQKNACMGTHAVDKKLVGPSYQDVTAKYK
2-      KAQEIANKNACMGCHQVDKKLVGPSYKEVAAKYK
3-      KAQEIANKNACMGCHQVDKKLVGPAYKDVAKYK
    
```

```

cyt_c_RalsH16      MKQFVIAALMLGAAASAHAVDAAKAQEIANKNACMGCHQVDKKLVGPSYKEVAAKYKGDK
cyt_S22            -----VDVAKAQQIAQKNACMGCHAVDKKLVGPSYQDVAAKYKGNK
                   ** .****: **:***** *****: *****: *

cyt_c_RalsH16      NALATLTKKVKSGSGVWGPVMPANAALNDADLKTVVEWVLGAPAK
cyt_S22            GAACTLVAKVK-----
                   .* .** .***
    
```

Figure 9 : Alignement de la séquence N-terminale du cytochrome de *R. solanacearum* str. S22 (1) avec ceux de *R. eutropha* H16 (2) et *R. eutropha* JMP134 (3). En rouge sont indiqués les résidus identiques.

Cette même séquence N-terminale a été comparée aux cytochromes codés en opéron avec les gènes codant pour l'arsénite oxydase. Le pourcentage d'identité entre ce cytochrome et celui de NT-26 (Santini *et al.*, 2007) et d'*Ag. tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006) est pratiquement nul. Par contre, la séquence N-terminale du cytochrome purifié chez *R. solanacearum* str. S22 possède 47 % d'identité avec le cytochrome *c* de *H. arsenicoxydans* (gène *aoxD*) (Muller *et al.*, 2003) et 35 % d'identité avec le gène codant pour un cytochrome *c* de *Thiomonas* sp. (Slyemi *et al.*, 2007). Ces deux dernières valeurs sont significatives (> 30 %) mais sont très inférieures au 79 % d'identité obtenu avec le cytochrome *c* de l'opéron de la sulfite oxydase de *R. eutropha* H16 et *R. eutropha* JMP134.

Nous avons donc voulu savoir si la quantité de cytochrome c_{551}/c_{552} de *R. solanacearum* str. S22, était plus importante dans les cellules cultivées en présence qu'en absence d'arsénite. Nous avons donc analysé la fraction soluble de cette bactérie cultivée dans ces deux conditions puis les cytochromes *c* ont été révélés par coloration au TMBZ (Figure 10). Dans cette expérience, nous avons déposé la même quantité de protéines solubles pour les deux types de cultures sur le gel SDS-PAGE.

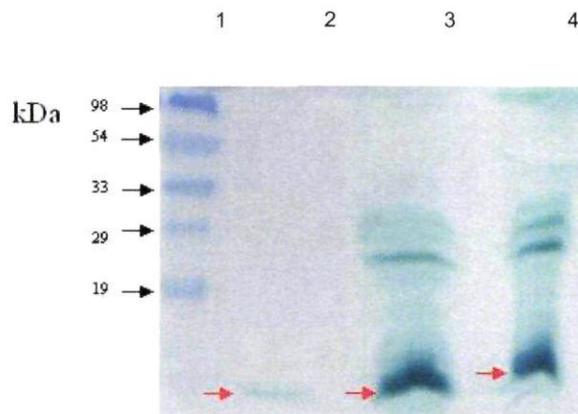


Figure 10: Révélation des hèmes des cytochromes *c* (par la méthode TMBZ) de la bactérie *R. solanacearum* str. S22. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : périplasma provenant de cellules cultivées en présence d'arsénite. Piste 3: fraction soluble totale de bactéries cultivées en absence d'arsénite de sodium. Piste 4 : fraction soluble totale de bactéries cultivées en présence d'arsénite de sodium.

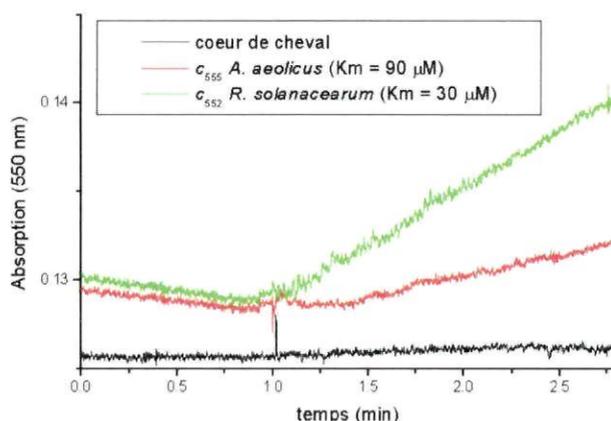
Le cytochrome c_{551}/c_{552} est présent en même quantité dans une culture de bactéries cultivées en absence et en présence de 2 mM d'arsénite de sodium (flèche rouge). Donc le gène codant pour ce cytochrome n'est vraisemblablement pas régulé par la présence d'arsénite. Cette observation n'est cependant pas suffisante pour conclure que le cytochrome c_{551}/c_{552} n'est pas le partenaire physiologique de l'enzyme car l'étude équivalente chez la bactérie NT-26 a démontré que le gène du cytochrome *c* de

cette souche, bien qu'organisé en opéron avec les gènes codant pour l'enzyme, ne semble pas subir la même régulation. Par ailleurs on peut observer sur le gel qu'un cytochrome d'un poids moléculaire d'approximativement 20 kDa semble lui induit par l'As(III). Celui-ci, comme les autres, ne sont malheureusement qu'en quantité bien inférieure au cytochrome c_{551}/c_{552} et ont demandé beaucoup plus de cellules pour pouvoir être mis en évidence. Ils sont en cours de caractérisation.

4.4.3. Transfert d'électrons de l'arsénite oxydase vers le cytochrome

c_{551}/c_{552}

Pour déterminer s'il y a transfert d'électrons entre l'arsénite oxydase et le cytochrome c_{551}/c_{552} , nous avons mis en présence dans du tampon MES 50 mM pH 6, ce cytochrome (2 μM) et cette enzyme partiellement purifiée, puis nous avons ajouté l'arsénite de sodium. Dans ce test, le cytochrome passe de l'état oxydé à l'état réduit, il y a donc une augmentation de la densité optique (DO) à 552 nm (coefficient d'absorption du cytochrome : 25 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Lorsque nous comparons les activités arsénite oxydase en présence de DCPIP (4 μM) (de coefficient d'absorption du même ordre), à celles obtenues en présence du cytochrome purifié, nous pouvons voir que l'activité est 10 fois plus importante en présence du cytochrome que du DCPIP (Tableau 6). Ce résultat suggère que l'efficacité de transfert d'électrons de l'enzyme vers le DCPIP est bien moins importante que celle de l'enzyme vers le cytochrome. Si ce cytochrome n'est pas le partenaire physiologique, il est en tout cas un très bon accepteur d'électrons pour l'enzyme et ce sans PMS qui est en revanche indispensable avec le DCPIP. D'autres cytochromes comme celui de coeur de cheval efficace avec l'enzyme de NT-26 ou le c_{555} d' *Aquifex aeolicus* montrent une activité moindre ou nulle (figure 11).



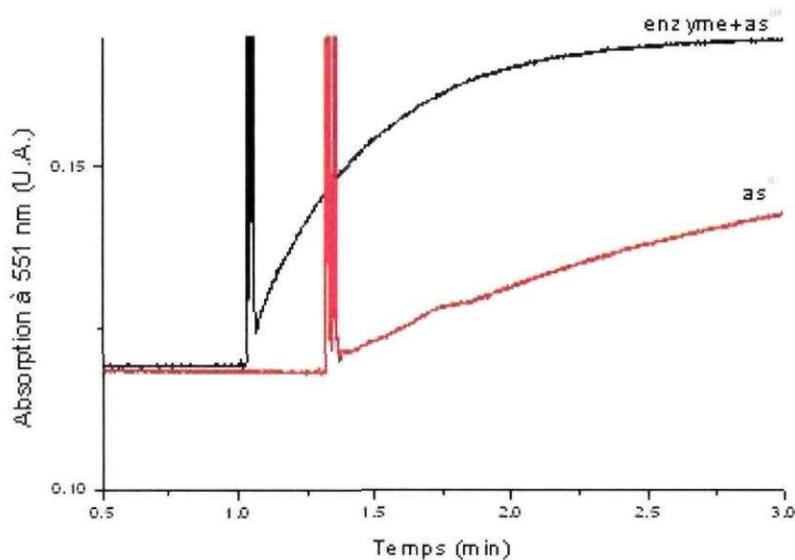


Figure 11 : Cinétique du cytochrome dilué dans un tampon MES 50 mM pH 6. Les pics correspondent à l'ajout de l'enzyme et de l'arsénite de sodium (Trait noir) ou de l'arsénite de sodium seul (Trait rouge).

	Activité (μmol de DCPIP réduit. min^{-1} $\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines totales)	Activité (μmol de cytochrome réduit. min^{-1} . mg^{-1} de protéines totales)
Activité arsénite oxydase	91	879

Tableau 6 : Comparaison de l'activité arsénite oxydase entre deux accepteurs d'électrons : le cytochrome c_{551}/c_{552} et le DCPIP.

Ce résultat peut suggérer que ce cytochrome c_{551}/c_{552} est le partenaire physiologique de l'arsénite oxydase chez *R. solanacearum* str. S22. Cependant, on ne peut pas exclure que l'arsénite oxydase puisse transférer ses électrons à un cytochrome *c* autre que son partenaire physiologique si son potentiel d'oxydoréduction le permet, mais le potentiel est loin d'être un facteur déterminant. Ce type de transfert a été montré chez NT-26 (Santini et vanden Hoven, 2004), où les électrons peuvent être transférés de l'arsénite oxydase vers un cytochrome *c* de cœur de cheval. Dans ce cas là justement le potentiel ne joue absolument pas, c'est la structure qui intervient. Le travail de thèse de Simon DUVAL (au BIP) a montré qu'il existe pour l'instant deux classes structurales de cytochromes réagissant avec l'arsénite oxydase, l'une définie par le cytochrome de

cœur de cheval et celui de NT-26, et l'autre définie par les cytochromes AoxD d'*Herminiimonas*, C₅₅₁/C₅₅₂ de S-22 et C₅₅₅ d' *Aquifex aeolicus*. Ils sont tous exactement au même potentiel et pourtant avec le cytochrome c de cœur de cheval, l'activité est nulle (figure 10).

4.5. ETUDE DE LA SPECIFICITE VIS A VIS DU SUBSTRAT

Aucune des bactéries du genre *Ralstonia* dont le génome a été séquencé -que ce soit les espèces *eutropha*, *metallidurans* ou *solanacearum*- ne possède les gènes *aoxAB* codant pour l'arsénite oxydase (étude de génome). Mais, le cytochrome C₅₅₁/C₅₅₂ purifié dans l'étape précédente possède un cytochrome fortement homologue chez *R. eutropha* qui est le partenaire physiologique de la sulfite oxydase (puisqu'il se trouve dans l'opéron *sox*). Nous avons donc voulu savoir si la bactérie *R. solanacearum* str. S22 avait elle aussi une enzyme sulfite oxydase, et en outre si l'arsénite oxydase partiellement purifiée a une activité sulfite oxydase.

4.5.1. Métabolisme

Nous avons utilisé le sulfite de sodium pour des expériences de mesures d'activité *in vitro*. Nous avons adapté le protocole de Harvey et Fridovich (1971) pour la mesure de l'activité avec le sulfite de sodium. Pour cette expérience, nous avons comparé les activités arsénite oxydase et sulfite oxydase dans deux conditions de cultures de la bactérie *R. solanacearum* str. S22, c'est à dire en absence et en présence de 2 mM d'arsénite de sodium. Les résultats sont représentés dans le tableau 7.

		Activité (μmol de ferricyanure réduit. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines totales)
Activité arsénite oxydase	S22 - arsénite	$0,67.10^{-3}$
	S22 + arsénite	$2,6.10^{-3}$
Activité sulfite oxydase	S22 - arsénite	$4,3.10^{-3}$
	S22 + arsénite	$4,3.10^{-3}$

Tableau 7 : Comparaison des activités arsénite oxydase et sulfite oxydase de la fraction soluble de la bactérie *R. solanacearum* str. S22 cultivée en absence ou en présence de 2 mM d'arsénite de sodium.

Les activités arsénites oxydase sont inférieures aux valeurs d'activité en présence de DCPIP (Tableaux 2 et 5) car ces mesures (Tableau 7) ont été effectuées en absence de PMS. En effet, la sulfite oxydase réduit le ferricyanure et le DCPIP en présence de PMS.

Lorsqu'on compare les activités en fonction des conditions de culture, on peut dire que l'activité arsénite oxydase est 4 fois plus importante pour les cellules cultivées en présence d'arsénite qu'en absence. Par contre l'activité sulfite oxydase est comparable dans les deux conditions de culture. Grâce à ces résultats, nous pouvons dire que dans cette bactérie il existe vraisemblablement deux enzymes, une arsénite oxydase et une sulfite oxydase.

4.5.2. Spécificité

Afin de vérifier si l'enzyme purifiée est spécifique de l'arsénite de sodium, nous avons réalisé des mesures d'activité arsénite oxydase et sulfite oxydase avec l'enzyme et le cytochrome C_{551}/C_{552} purifiés. Ces expériences *in vitro*, ont été effectuées en présence seulement du cytochrome C_{551}/C_{552} purifié et de l'arsénite oxydase purifiée car nous voulions vérifier que le transfert d'électrons de l'enzyme au cytochrome était possible en présence d'arsénite et de sulfite de sodium. Avec l'enzyme pure, aucune activité sulfite oxydase n'est détectée. En revanche, le sulfite s'avère être un fort inhibiteur de l'arsénite oxydase (Figure 12).

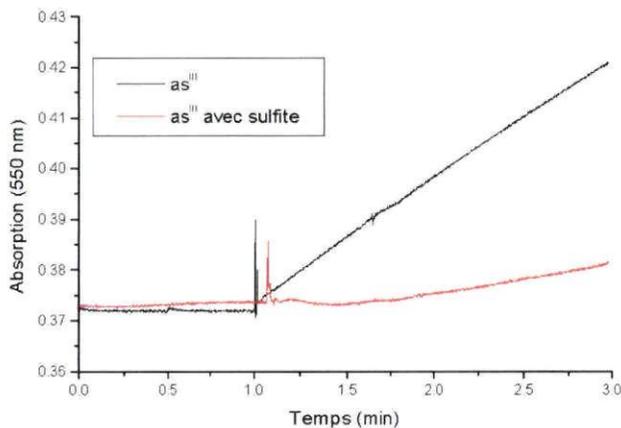


Figure 12 : activité de l'enzyme pure en présence d'As(III) ± sulfite.

L'affinité calculée de l'enzyme de S22 pour l'As(III) est de 4 μ M tandis que la constante d'inhibition du sulfite se situe autour de 8 μ M!

4.6. CONCLUSION ET DISCUSSION SUR LES RESULTATS DE LA PHASE 3

4.6.1. L'enzyme arsénite oxydase

Nous avons montré que l'enzyme arsénite oxydase de *R. solanacearum* str S22 est associée à la membrane, puisque l'activité est retrouvée majoritairement dans les sphéroplastés. Mais cet ancrage est fragile et l'enzyme se détache de la membrane lors d'une casse plus drastique à la presse de French. Chez *Al. faecalis*, l'activité arsénite oxydase se retrouve également dans la membrane cytoplasmique après action du lysozyme mais se retrouve soluble lors d'un mode de casse plus rigoureux (Anderson *et al.*, 1992). Le détachement de la protéine se fait vraisemblablement par coupure de l'ancre si l'on en croit la séquence de la protéine ainsi purifiée et cristallisée ne présentant plus l'ancre en N-terminal (Ellis *et al.*, 2001). Par contre, pour les bactéries NT-26 et NT-14 (Santini et vanden Hoven, 2004 ; vanden Hoven et Santini, 2004), l'activité arsénite oxydase se retrouve dans la fraction soluble, même après action ménagée du lysozyme. Ce résultat a été confirmé par ailleurs au laboratoire BIP/CNRS. Les auteurs en ont déduit que l'enzyme ne possède pas de domaine transmembranaire et que la séquence de 40 résidus codée par le gène de *aroB*, absente de la protéine purifiée est une pré-séquence clivée après transport de l'enzyme et passage de la membrane plasmique. Ces auteurs en concluent que seule une association avec une autre protéine peut être à l'origine de la présence de l'arsénite oxydase associée à la membrane chez *Al. faecalis* (Anderson *et al.*, 1992) et *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2003). Une toute autre interprétation possible serait que dans tous les organismes, de façon comparable aux protéines de Rieske du complexe *bc* (Lebrun *et al.*, 2003), la protéine AroB (ou AoxA) est transloquée à travers la membrane plasmique et reste ancrée à celle-ci grâce à une séquence d'export qui joue également le rôle d'ancre. Cette interprétation est basée sur la constatation que dans le cas de *Chloroflexus aurantiacus*, l'enzyme reste, pour une part au moins majoritaire, accrochée à la membrane (Lebrun *et al.*, 2003) même après casse à la presse de french (le même type de résultat est obtenu sur l'enzyme de *Herminiimonas* qui est étudiée par ailleurs au BIP). En revanche, contrairement à la protéine de Rieske du *bc*, le clivage est très fréquent et l'on retrouverait diverses situations suivant la fragilité de la séquence. Les cas de fragilité extrême seraient représentés par NT-26 et NT-14, les cas intermédiaires par *Al. faecalis*, *H. arsenicoxydans* et *Thiomonas* sp. et les cas les moins labiles seraient représentés par *Herminiimonas* et *Chloroflexus aurantiacus*.

Les arsénite-oxydases connues possèdent une grande sous-unité dont le poids moléculaire varie entre 86 et 98 kDa. Dans notre expérience en tamis moléculaire, le poids moléculaire apparent est d'environ 120 kDa. Le résultat des analyses RPE, gel d'électrophorèse SDS et MS, permet d'avancer que la petite sous-unité de l'arsénite oxydase est présente et représente la bande à environ 14 kDa sur gel. Les résultats de RPE, digestion trypsique et séquençage N-terminal identifient clairement AoxB. Au bilan de toutes ces expériences, nous avons démontré que l'arsénite oxydase de *R. solanacearum* str. S22 était classique, de poids moléculaire de 104 kDa donc monomérique, avec la particularité de présenter une partie de son partenaire associé à

l'enzyme ce qui entraîne un poids moléculaire natif légèrement trop élevé. De plus, cette enzyme est thermostable.

4.6.2. Le partenaire physiologique

Nous avons purifié deux protéines : l'enzyme arsénite-oxydase et le cytochrome c_{551}/c_{552} de *R. solanacearum* str. S22. La similarité de séquence trouvée entre le cytochrome c_{551}/c_{552} de *R. solanacearum* str. S22 et celui de *R. eutropha* codé par l'opéron *sox* d'une part (79 % d'identité) ou certains cytochromes des opérons *aox* connus d'autre part (de l'ordre de 40 % avec les cytochromes de *H. arsenicoxydans* et *Thiomonas* sp.) peut avoir deux interprétations. Le cytochrome isolé peut être hérité d'un opéron *sox* mais faire partie de l'opéron *aox*. En effet, la similarité avec le cytochrome de *R. eutropha* est fort probablement due à la proximité phylogénique des deux organismes. De plus, la faible similarité avec les autres cytochromes connus pour réagir avec l'arsénite oxydase n'est pas surprenante étant donné les similarités faibles au sein de cette famille de cytochromes (Santini *et al.*, 2007). Le fait que le cytochrome est présent en même quantité dans les cellules cultivées en présence et en absence d'arsénite n'est pas inattendu puisque le gène codant pour le cytochrome c_{552} de NT-26, qui fait partie de l'opéron *aox*, n'est pas régulé de la même façon que les gènes codant pour cette enzyme. Dans cette hypothèse le cytochrome c_{551}/c_{552} pourrait être le partenaire physiologique de l'arsénite oxydase. L'autre hypothèse serait que dans la bactérie *R. solanacearum* str. S22 (comme dans *R. eutropha*) ce cytochrome fasse partie de l'opéron *sox*. Il faut savoir que si la sulfite-oxydase utilise souvent un cytochrome comme partenaire, celui-ci est loin de faire systématiquement partie de l'opéron. Le cytochrome peut donc être un élément mouvant génétiquement entre souche et/ou avoir un double rôle.

Pour la bactérie *A. faecalis* deux partenaires de l'arsénite oxydase ont été proposés, l'azurine et un cytochrome *c* dont les gènes ne font pas partie ni l'un ni l'autre du même opéron que ceux codant pour l'arsénite oxydase (Anderson *et al.*, 1992). Pour *H. arsenicoxydans* les gènes codant pour l'arsénite oxydase constituent un opéron avec des gènes codant pour un cytochrome *c* et une nitroréductase (Muller *et al.*, 2003). Chez d'autres microorganismes, le gène codant pour un cytochrome *c* se trouve également en opéron avec l'arsénite oxydase, et il a été démontré que ce cytochrome *c* est régulé par l'arsénite chez *Ag. tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006) et *Thiomonas* sp. (Slyemi *et al.*, 2007). Enfin, pour la bactérie NT-26 il a été montré récemment qu'il existe un gène codant pour un cytochrome dans l'opéron *aox*, mais que bien que celui-ci ait été suggéré pour être le partenaire de l'enzyme, la délétion de ce gène ne semble pas ralentir la croissance sur arsénite (Santini *et al.*, 2007). L'enzyme pourrait donc fonctionner dans des contextes divers : unicité et spécificité stricte de partenaire avec co-régulation d'expression, multiplicité de partenaires sans aucun lien de régulation, et toutes les situations intermédiaires.

Nous avons aussi montré que la bactérie *R. solanacearum* str. S22 possède une activité sulfite oxydase. Cette enzyme est présente chez les bactéries cultivées en absence et en présence de 2 mM d'arsénite de sodium. Or, Gardlik et Rajagopalan (1991), ont démontré qu'en présence d'oxygène et de 10 mM d'arsénite, la sulfite oxydase était inactivée. Une manière de mettre en accord ces deux résultats serait

d'envisager que les 2 mM d'arsénite de sodium ajoutés au milieu de culture de *R. solanacearum* str. S22 ne permettent pas d'inactiver l'activité sulfite oxydase présente dans nos échantillons.

Il est à noter qu'une réaction entre l'arsénite et la sulfite oxydase est connue (Gardlik et Rajagopalan, 1991) et que c'est elle qui est à l'origine de l'inactivation de la sulfite oxydase par l'arsénite en présence d'oxygène. Des expériences sur notre enzyme partiellement purifiée en présence de différentes concentrations de sulfite ont défini une inhibition compétitive avec une constante de 8 μM . L'enzyme n'étant que partiellement purifiée au stade où cette activité croisée a été observée, il est probable qu'il reste de l'enzyme sulfite oxydase qui réagisse avec le sulfite de sodium lors de la réaction *in vitro* en spectrophotométrie.

4.6.3. Du point de vue du biocapteur

Le protocole de purification mis au point fin 2007 permet d'obtenir un rendement qui est tout à fait honorable du fait que l'enzyme de départ est membranaire. Il faut en revanche envisager une autre échelle de culture afin d'obtenir une enzyme pure en quantité suffisante pour poursuivre les travaux de caractérisation de l'enzyme, et pour initier des travaux en biocapteur. Ces travaux de purification d'une enzyme native soulignent la difficulté d'obtenir d'« importantes » quantités d'enzyme, et donc l'intérêt d'essayer de mettre au point un système de surexpression de l'enzyme. Ces travaux confirment également la très bonne stabilité de l'enzyme vis-à-vis de la température (ce qui avait été observé dans la phase 1). Les essais de casse cellulaires montrent enfin qu'il est possible d'avoir une enzyme soluble et active ; rappelons que le fait d'avoir une enzyme soluble permet une manipulation plus facile de l'enzyme pour sa mise en œuvre dans un biocapteur.

En revanche, la mise en évidence de l'inhibition par le sulfite avec une constante du même ordre que l'affinité pour l'arsénite souligne l'importance d'initier très rapidement les tests d'interférences. En effet, une interférence du dosage avec le sulfite pourrait poser des problèmes quant à la mise au point du biocapteur dans la mesure où certaines eaux souterraines et de surface polluées à l'As(III) contiennent des concentrations assez élevées de sulfite (on trouve par exemple une concentration de 1,5 mM dans les eaux de Chéni dans le Limousin). Ceci nécessiterait donc de faire une étude pour déterminer dans quelle mesure le sulfite est un interférent au dosage de l'arsénite, et de déterminer comment l'éliminer de l'échantillon à doser. Dans l'hypothèse où aucun moyen pour éliminer le sulfite ne serait trouvé, il est alors envisageable d'utiliser ce type de biocapteur seulement dans des eaux à teneurs en sulfite faible. En tout cas, il est illusoire de penser qu'il suffirait de changer de source d'arsénite-oxydase dans la mesure où les souches NT-26 et *Herminiimonas* montrent la même sensibilité.

5. Problèmes rencontrés au cours du projet Arsenic Sensor

Comme décrit précédemment dans ce rapport, la première étape du projet a été de rédiger un cahier des charges pour le dosage de l'As(III) par un biocapteur dans des eaux souterraines. Afin d'y répondre, trois enzymes ont été sélectionnées sur la base de leur activité et de leur stabilité vis-à-vis de différents paramètres tels que la température et le pH (phase 1).

La mise au point d'un biocapteur (tests en laboratoire, sur site, en prototype), et par la suite la commercialisation de cet outil, nécessitent une grande quantité d'enzyme. Les bactéries produisant une arsénite-oxydase et sélectionnées dans la phase 1 n'ayant pas un fort taux d'expression de l'enzyme, la mise au point d'un système de surexpression des enzymes s'est révélée indispensable, afin d'obtenir facilement la grande quantité d'enzyme nécessaire à la mise au point d'un biocapteur. Ce travail de génétique moléculaire visant à séquencer, amplifier, cloner, surexprimer les gènes codant pour les arsénite-oxydases sélectionnée, a fait l'objet de la phase 2 du projet.

Il est très difficile d'estimer le temps nécessaire au clonage d'un gène dans la mesure où en fonction du gène, le clonage peut être très rapide ou au contraire prendre beaucoup de temps, et parfois même ne pas être possible. Les travaux de biologie moléculaire du projet Arsenic Sensor ont ainsi pris plus de temps qu'initialement prévu. Ainsi, les travaux de la phase 2 n'ont pas permis, au bout des 3 années du projet, d'obtenir une enzyme pure, fonctionnelle, et produite en grande quantité. Il s'est en effet avéré qu'il n'était pas possible de surproduire une enzyme active avec le système de surexpression choisi. En fait, dans notre cas, l'enzyme est bien surproduite mais n'est pas active. Ce cas n'est pas un cas isolé, certaines enzymes ont besoin de systèmes enzymatiques particuliers pour avoir une maturation correcte. On ne peut malheureusement pas déterminer à l'avance si une enzyme pourra ou non être surproduite correctement. La construction génétique réalisée dans le cadre de ce projet ne permet donc pas de surproduire et de purifier une enzyme recombinante active et soluble. Une nouvelle construction peut être envisagée dans un nouveau plasmide, avec délétion de la partie du gène codant pour les acides aminés hydrophobes, et éventuellement un nouveau placement de la queue histidine. Ces essais sont en cours au laboratoire de Violaine Bonnefoy.

Il a donc été décidé à la fin des 3 années du projet, en accord avec l'ADEME, de prolonger d'une année le projet Arsenic Sensor (4 ans au lieu de 3) de même que la durée de la thèse d'Aurélie Lieutaud (4 ans également), et ainsi de réorienter le projet pour purifier une enzyme native et non recombinante (phase 3 du projet) pour initier des travaux de biocapteur (phase 4). L'objectif d'aller jusqu'au développement d'un prototype a été abandonné. L'objectif de cette 4^{ème} année était également de permettre à Aurélie Lieutaud de poursuivre ses travaux afin de synthétiser ses résultats sous forme d'une publication, et de pouvoir ainsi soutenir sa thèse.

La quatrième année du projet a donc permis de lancer la phase 3. Un protocole de purification de l'enzyme de *Ralstonia solanacearum* a ainsi été élaboré grâce à l'utilisation de différents types de chromatographie. Cette bactérie a été choisie pour la bonne activité de son enzyme et son rendement cellulaire. La caractérisation de l'enzyme a ensuite eu lieu pour déterminer son poids moléculaire, sa composition en sous-unité, son activité spécifique. Le protocole de purification a permis d'obtenir suffisamment d'enzyme pour réaliser une caractérisation de cette enzyme, mais n'a pas permis, dans un premier temps, de purifier suffisamment d'enzyme pour réaliser des essais en biocapteur. Ceci illustre d'ailleurs l'intérêt d'avoir cherché au préalable à mettre au point un système de surexpression de l'enzyme (qui n'a malheureusement pas marché). Le protocole mis au point aujourd'hui (fin 2007) ainsi que les nouvelles conditions de croissances pourraient toutefois permettre maintenant d'obtenir assez d'enzyme pour réaliser des essais en biocapteur. Il n'a donc pas été possible de réaliser des essais en biocapteur à la fin du projet Arsenic Sensor. L'ADEME a validé le fait que l'objectif de la fin du projet était la soutenance de la thèse d'Aurélié Lieutaud.



6. Conclusions

Ce document est le rapport final du projet Arsenic Sensor cofinancé par l'ADEME pour une durée de 4 ans. Il présente donc une synthèse des travaux effectués et des résultats obtenus. Le présent projet n'a pas pu être réalisé jusqu'à son terme dans la mesure où il n'a pas été possible d'obtenir une enzyme pure en grande quantité pour effectuer des essais en biocapteurs.

Tous les travaux initialement prévus dans le projet Arsenic Sensor n'ont donc pas pu être réalisés, et aucun prototype finalisé ne peut être proposé à la fin de ce projet. On peut cependant tirer plusieurs points positifs et conclusions pour l'avenir suite à ce projet :

- les travaux réalisés ont fait l'objet d'une publication scientifique qui est acceptée pour publication dans *Environmental Microbiology*, et d'autres publications devraient pouvoir être rédigées dans les mois à venir,
- grâce au financement et au travail réalisé et aux résultats obtenus dans le cadre de ce projet et donc de la thèse ADEME/BRGM associée, Aurélie Lieutaud pourra soutenir sa thèse et obtenir un Doctorat de Microbiologie Moléculaire et Biotechnologie,
- l'intérêt de développer un biocapteur à As(III) est démontrée dans la mesure où plusieurs laboratoires, à l'échelle internationale, s'intéressent à la mise au point de biocapteurs pour le dosage de l'arsénite. De plus, la possibilité d'utiliser une arsénite oxydase comme biorécepteur d'un biocapteur à enzyme pour le dosage de l'As(III) a été démontré (Male et al., 2007),
- il pourrait potentiellement être possible de poursuivre ces travaux dans le cadre de projets Européens (7^{ème} PCRD) par exemple, dans la mesure où un certain nombre d'appels d'offre s'intéressent aux (bio)technologies dans le domaine environnemental, et en particulier au développement et à l'amélioration d'outils permettant le dosage de polluants pour leur suivi sur les sites pollués,
- d'une manière générale, le déroulement de ce projet a démontré qu'il était difficile de réaliser un projet de 3 ans allant d'un travail de recherche fondamentale à la réalisation d'un prototype. Arsenic Sensor montre que le travail de recherche fondamentale -i.e. la sélection, surexpression et purification d'une enzyme- est un projet à lui seul, et nécessite au minimum 3-4 ans de recherche et l'intervention de différentes compétences. Le travail d'essais en biocapteur, de mise au point, validation sur site et réalisation d'un prototype constitue lui aussi à lui seul un projet à part entière.

7. Bibliographie

- Anderson G., Williams J., Hille R. (1992). The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydrolase. *J. Biol. Chem.* 267: 23674-23682.
- Ellis P., Conrads T., Hille R., Kuhn P. (2001). Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9: 125-132.
- Fujimoto H., Wakabayashi M., Yamashiro H., Maeda I., Isoda K., Kondoh M., Kaxase M., Miyasaka H., Yagi K. (2006). Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 332-338.
- Gardlik S., Rajagopalan K. (1991). The mechanisms of inactivation of sulfite oxidase by periodate and arsenite. *J. Biol. Chem.* 266: 16627-16632.
- Harvey J., Fridovich I. (1971). Hepatic sulfite reductase. *J. Biol. Chem.* 216: 359-366.
- Kashyap D., Botero L., Franck W., Hasset D., McDermott T. (2006). Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 188: 1081-1088.
- Lebrun E., Brugna M., Baymann F., Muller D., Lièvreumont D., Lett M.-C., Nitschke W. (2003). Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol. Biol. Evol.* 20: 686-693.
- Male K., Hrapovic S., Santini J., Luong J. (2007). Biosensor for arsenite using arsenite oxidase and multiwalled carbon nanotube modified electrodes. *Anal. Chem.* 79: 7831-7837.
- Michel C., Battaglia-Brunet F., Tran Minh C., Bruschi M., Ignatiadis I., 2003. Amperometric cytochrome c_3 -based biosensor for chromate determination. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 345-352.
- Michel C., Ouerd A., Battaglia-Brunet F., Guigues N., Grasa J.-P., Bruschi M., Ignatiadis I. (2006). Cr(VI) quantification using an amperometric enzyme-based sensor: interference and physical and chemical factors controlling the biosensor response in ground waters. *Biosens. Bioelectron.* 22: 285-290.
- Muller D., Lièvreumont D., Simeonova D., Hubert J., Lett M.-C. (2003). Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *J. Bacteriol.* 185: 135-141.
- Santini J., vanden Hoven R. (2004). Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186: 1614-1619.

Santini J., Kappler U., Ward S., Honeychurch M., vanden Hoven R., Bernhardt P. (2007). The NT—26 cytochrome c552 and its role in arsenite oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 189-196.

Schaefer A. (2003). Biosensors for quickly detecting arsenic in drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 37: 378A-379A.

Scott D., Ramanathan S., Shi W., Rosen B., Daunert S. (1997). Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal. Chem.* 69: 16-20.

Stocker J., Balluch D., Gsell M., Harms H., Feliciano J., Daunert S., Malik K., Roelof van der Meer J. (2003). Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ. Sci. Technol.* 37: 4743-4750.

Slyemi D., Ratouchniak J., Bonnefoy V. (2007). Regulation of the arsenic oxidation encoding genes of a moderately acidophilic, facultative chemolithoautotrophic *Thiomonas* sp. Accepté pour publication dans *Advanced Materials Research*.

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

Verma N., Singh M. (2005). Biosensors for heavy metals. *Biometals* 18 : 121-129.

8. Annexe 1

Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study

Katia Duquesne,^{1*} Aurélie Lieutaud,^{2*}
Jeanine Ratouchniak,² Daniel Muller,^{3†}
Marie-Claire Lett³ and Violaine Bonnefoy^{2*}

¹C.N.R.S., Institut de Biologie Structurale et de
Microbiologie, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes
Macromoléculaires, Marseille, France.

²C.N.R.S., Institut de Biologie Structurale et de
Microbiologie, Laboratoire de Chimie Bactérienne,
Marseille, France.

³C.N.R.S. and Université Louis Pasteur, Génétique
Moléculaire, Génomique, Microbiologie, Strasbourg,
France.

Summary

An autotrophic bacterium able to gain energy from the oxidation of arsenite was isolated from arsenite-containing acid mine drainage waters. It belongs to the genus *Thiomonas* as shown by DNA-DNA hybridization experiments, 16S rRNA gene sequence, quinone and fatty acid content analyses. Carboxysomes were observed and the *cbbSL* genes encoding the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase were detected, confirming that this bacterium is able to fix CO₂. Arsenite oxidation was catalysed by a membrane-bound enzyme, and this activity was detected essentially in cells grown in the presence of arsenite. The genes encoding the two subunits of the arsenite oxidase of the *Thiomonas* isolate have been sequenced. The small subunit has a characteristic Tat signal sequence and contains the residues binding the [2Fe-2S] Rieske-type cluster. The large subunit has the [3Fe-4S] cluster-binding motif as well as the residues proposed to bind arsenite. In addition, most of the residues interacting with the molybdenum cofactor are conserved. The genes encoding both subunits belong to an operon, likely with a gene encoding a cytochrome *c*. The

expression of this operon is greater in cells grown in the presence than in the absence of arsenite, in agreement with a transcriptional regulation in the presence of this metalloid.

Introduction

Acidic environments are often associated with the leaching of metal sulfide-rich ores, usually exposed to weathering in mining regions. These rock drainage waters are considered as extreme environments: not only they are acidic, but also they characteristically contain highly elevated concentrations of soluble metals, often at toxic concentrations. In addition, organic substances are usually present in very low amounts. However, in spite of these harsh conditions, some eukaryotes and prokaryotes live and even thrive there (Bond *et al.*, 2000; Lopez-Archilla *et al.*, 2001; Amara Zettler *et al.*, 2002; Baker and Banfield, 2003; Gonzalez-Toril *et al.*, 2003; Johnson and Hallberg, 2003; Baker *et al.*, 2004; Lopez-Archilla *et al.*, 2004). Among them, the chemolithoautotrophic prokaryotes gain energy from the metals/metalloids or the sulfur compounds present in the rock drainage waters and fix atmospheric CO₂ and N₂. The other prokaryotes are essentially opportunists, feeding from organic matter derived from the metabolic activity of the chemolithoautotrophs. Because of their extreme life conditions, these chemolithoautotrophs draw more and more interest. Among them, some are able to gain energy for their growth from the oxidation of arsenite [As(III), a well-known and highly toxic compound], and were proposed not only to exist as the early stages of life on earth (Lebrun *et al.*, 2003) but also to reflect the primitive microbial ecosystem on Mars or Europa (Oremland and Stolz, 2003). A number of As(III)-oxidizing prokaryotes have been described, but only few of them have been shown to gain energy from the reaction (see References in Ehrlich, 2002; Stolz *et al.*, 2006; Inskeep *et al.*, 2007; Rhine *et al.*, 2007). Among the *Thiomonas* genus [Gram-negative, mesophilic moderate acidophiles, and facultative chemolithoautotrophs (Moreira and Amils, 1997)], oxidation of As(III) represents a detoxification mechanism (Bruneel *et al.*, 2003; Battaglia-Brunet *et al.*, 2005), except for two strains that were able to use this metalloid as an energy

Received 1 May, 2007; accepted 17 August, 2007. *For correspondence. E-mail bonnefoy@ibsm.cnrs-mrs.fr; Tel. (+33) 4 91 16 41 48; Fax (+33) 4 91 71 89 14. †Present address: University of Tokyo, Institute for Medical Sciences, Laboratory of Bacterial Infection, Tokyo, Japan. *These authors contribute equally to the work.

source: *Thiomonas* sp. NO115 (Coupland *et al.*, 2003) and *Thiomonas arsenivorans* (Battaglia-Brunet *et al.*, 2005).

This article reports on the isolation and the characterization of a new *Thiomonas* strain able to grow chemolithoautotrophically on As(III), the evidence of a membrane-bound arsenite oxidase, the sequencing of the arsenite oxidase encoding genes and their regulation.

Results and discussion

Isolation of an arsenite-oxidizing bacterium from the Reigous spring

A sample collected from the Reigous spring (Carnouliès, Gard, France) where soluble arsenic removal by adsorption was observed (Casiot *et al.*, 2003) was cultured on 9K basal salt medium pH 3 supplemented with As(III) 200 mg l⁻¹ for 1 year. Subcultures were performed each month in a fresh medium. Both bacterial growth and the disappearance of total soluble As and As(III) and the appearance of As(V) were observed, suggesting the oxidation of As(III) by the mixed culture as no growth nor As(III) oxidation was observed in abiotic conditions (data not shown). The bacterial population of this mixed culture, determined by 16S rRNA gene sequence analysis, was mainly composed of bacteria belonging to the *Thiomonas* genus [50% related to *Thiomonas* B1, B2 and B3 (Bruneel *et al.*, 2003) and Ynys1 and Ynys3 (Hallberg and Johnson, 2003) and 10% related to *Thiomonas therosulfata*] and to the *Burkholderia* genus (40%). When an aliquot of this subculture was spread on the 'mating' medium (Liu *et al.*, 2001) supplemented with 200 mg l⁻¹ As(III), two bacterial colony types could be distinguished by their morphologies after 5 days of incubation at 30°C: one ('3As') was tiny and pink-coloured, and the other was larger and creamish-white ('2As'). These were isolated and identified by 16S rRNA gene sequence analysis as belonging to the *Thiomonas* and *Burkholderia* genus respectively (Fig. S1). The growth of *Thiomonas* 3As alone on As(III) medium was much slower than in the presence of *Burkholderia* 2As suggesting a syntrophy between these two microorganisms. Only *Thiomonas* 3As was able to oxidize As(III) to As(V) on a synthetic medium supplemented with yeast extract (0.05%) and As(III) 150 mg l⁻¹ (Fig. 1).

Characterization of *Thiomonas* 3As

Isolate 3As is a motile Gram-negative rods with a polar flagellum (Fig. S2A). The phylogenetic analysis of the sequence of its nearly full-length 16S rRNA gene (1442 bp) showed that this bacterium is very closely related to several *Thiomonas* species: 100% homology

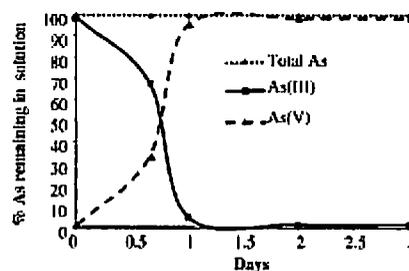


Fig. 1. Change in the level of total soluble arsenic, arsenite and arsenate during growth of *Thiomonas* 3As on 150 mg l⁻¹ As(III) and yeast extract 0.05%. The arithmetic plots show relative concentrations of As (dotted line and solid diamonds), As(III) (plain line and solid squares) and As(V) (dashed line and solid triangles).

with *Thiomonas* clone B3 (Bruneel *et al.*, 2003) and 99% homology with clones B1, B2 (Bruneel *et al.*, 2003), Ynys1 and Ynys 3 (Hallberg and Johnson, 2003) isolated from acid mine drainage waters and clone WM43 isolated from sulfidic cave stream biofilm (Macalady *et al.*, 2006) but also with *Thiomonas perometabolis* and *Thiomonas intermedia*, the latter being the *Thiomonas* reference strain (Fig. S1). Therefore, the 3As strain belongs to the *Thiomonas* genus of the *Proteobacteria* β -subdivision.

The DNA G+C content determined is 64.2% and is in the range of the *Thiomonas* genus (61–69%, see in Katayama *et al.*, 2006). DNA–DNA hybridizations of *Thiomonas* 3As against *Tm. intermedia* and *Tm. perometabolis* gave 32.15% and 71.95% homology, respectively, indicating that *Thiomonas* 3As belongs likely to the *Tm. perometabolis* species. However, the *Tm. perometabolis* type strain growth has been shown to be inhibited by As(III) (Battaglia-Brunet *et al.*, 2005). Further physiological and chemotaxonomical data are therefore required to determine unambiguously whether *Thiomonas* 3As belongs to the *Tm. perometabolis* species.

The analysis of cellular fatty acid composition (Table S1) showed the predominance of an unsaturated one containing 18 carbon atoms (18:1 ω 7c), and of saturated ones containing 16, 17 or 19 carbon atoms (16:0, 17:0 cyclo and 19:0 cyclo ω 8c). Many fatty acids common in *Proteobacteria* are present in *Thiomonas* 3As: normal straight chain saturated and unsaturated fatty acids (16:0, 16:1, 18:0 and 18:1) in combination with cyclo 17:0, cyclo 19:0, 2- and 3-hydroxy fatty acids. This confirms the assignment of *Thiomonas* 3As to the *Proteobacteria* group.

Analysis of the quinone content shows that *Thiomonas* 3As, like all members of the *Thiomonas* genus, contains ubiquinone-8 as the main quinone (Moreira and Amils, 1997).

Thiomonas 3As is able to grow aerobically in basal salts medium with As(III) or thiosulfate as the sole electron donor

(Fig. 2 and data not shown). No growth was observed in the absence of electron donor (data not shown). Better growth was obtained at lower As(III) concentration [compare 150 with 780 mg l⁻¹ As(III) in Fig. 2A]. In addition to chemolithoautotrophic growth on As(III) or thiosulfate, *Thiomonas* 3As grew also on yeast extract 0.01% or 0.05% (Fig. 2B) or casamino acids 0.125% (data not shown). Optimal growth was obtained at 30°C in CSM medium pH 6 supplemented with 0.05% yeast extract and 10 mM thiosulfate. Altogether these data are in agreement with As(III), thiosulfate, yeast extract or casamino acids being used as energy source. *Thiomonas* 3As has therefore a very versatile metabolism, being able to use organic and inorganic substrates as energy sources.

Thiomonas 3As grew in the absence of organic carbon source (Fig. 2A). As shown by electron microscopy of thin sections of *Thiomonas* 3As, each cell contains at least one characteristic polyhedral inclusion body which are clearly carboxysomes (Fig. S2B). In addition, the *cbbS* and *cbbL* genes encoding the small and the large subunits of ribu-

lose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), which is the central CO₂-fixing enzyme (Shively *et al.*, 2001), have been detected in *Thiomonas* 3As by polymerase chain reaction (PCR) with oligonucleotides deduced from *Tm. intermedia cbbS* and *cbbL* genes. The *Thiomonas* 3As *cbbL* and *cbbS* nucleotide sequences are 99% and 100% identical, respectively, to those of *Tm. intermedia* (data not shown). We can conclude therefore that *Thiomonas* 3As is indeed autotrophic and fixes CO₂ via the Calvin–Benson–Bassham cycle.

Thiomonas 3As is a moderate acidophile as it has been isolated from acid mine drainage (pH 3) and is able to grow between pH 3 and 7.5, except in the presence of thiosulfate which is acid labile. In that case, growth was observed between pH 4.9 and 7.5 (Duquesne, 2004).

Arsenite oxidase activity of *Thiomonas* 3As

Thiomonas 3As was able to grow on As(III) as sole energy source (Fig. 2) by oxidizing this metalloid to As(V) (Fig. 1). Arsenite oxidase activities determined in crude extracts of cells grown in the optimal conditions described above in the presence or in the absence of As(III) were 0.147 and 0.039 μmol As(III) oxidized min⁻¹ (mg of protein)⁻¹ respectively. Arsenite oxidase activity was found exclusively associated with the membrane fraction [0.125 and 0.024 μmol As(III) oxidized min⁻¹ (mg of protein)⁻¹ in cells grown in the presence or not of As(III) respectively], while no activity was detected in the soluble fraction. The results show unambiguously that the arsenite oxidase enzyme is membrane bound in *Thiomonas* 3As as observed in *Alcaligenes faecalis* (Anderson *et al.*, 1992) and *Hermimonas arsenicoxydans* str. ULPAs1 (Muller *et al.*, 2003), while it is located in the periplasm in *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14 (vanden Hoven and Santini, 2004) and in *Rhizobium* sp. str. NT-26 (Santini *et al.*, 2000). The difference in the arsenite oxidase subcellular localization from one bacterium to the other is presumably due to a weak attachment to the periplasmic side of the cytoplasmic membrane or to a proteolytic lability of the hinge region between the transmembrane segment and the periplasmic domain. According to the protocol followed to prepare the periplasmic fraction, this enzyme can be released. Indeed, when *Thiomonas* 3As cells were broken by increasing the pressure of the French press, the arsenite oxidase activity was detected in the soluble fraction (data not shown). As deduced from the amino acid sequence analysis of the arsenite oxidase subunits (see below), only one transmembrane region was detected: the hydrophobic segment of the Tat signal sequence from AoxA subunit. This region has been shown not to be cleaved and not to act as a transmembrane anchor helices in the Rieske iron-sulfur protein subunit of bacterial *bc*, and *b₅f* complexes (Van Doren *et al.*, 1993) and proposed to be a

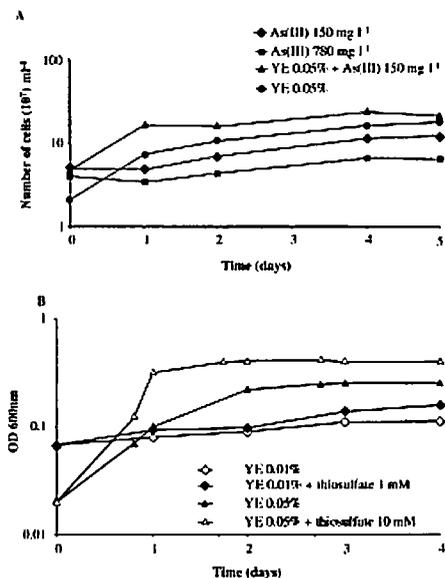


Fig. 2. Growth curves of *Thiomonas* 3As under different growth conditions: (A) on As(III) 150 (closed diamonds) and 780 mg l⁻¹ (closed squares), yeast extract (YE) 0.05% (closed circles) and yeast extract 0.05% supplemented with 150 mg l⁻¹ As(III) (closed triangles); (B) on yeast extract 0.01% (open diamonds), yeast extract 0.05% (closed triangles), yeast extract 0.01% supplemented with 1 mM thiosulfate (closed squares), yeast extract 0.05% supplemented with 10 mM thiosulfate (open triangles).

4 K. Duquesne et al.

membrane anchor in arsenite oxidases (Lebrun *et al.*, 2003). Our data are in agreement with this proposition.

In *Thiomonas* 3As, arsenite oxidase activity was higher (at least fourfold) in cells grown in the presence than in the absence of As(III), as reported previously for a number of arsenite-oxidizing bacteria (Philips and Taylor, 1976; Anderson *et al.*, 1992; Weeger *et al.*, 1999; Salmassi *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003) suggesting that the arsenite oxidase-encoding genes are regulated at the transcriptional level.

Sequencing of the arsenite oxidase-encoding genes

Using degenerate oligonucleotide primers based on conserved regions of the amino acid sequence of the large subunit of different arsenite oxidases, a fragment of the expected size (about 1200 bp) was amplified from the genomic DNA of *Thiomonas* 3As. This DNA fragment is internal to *aoxB* gene as the deduced amino acid sequence presents between 68% and 72% identity with the large subunit of the arsenite oxidase from *H. arsenicoxydans*, *Al. faecalis* and *Aeropyrum pernix*. Chromosome walking on both sides of the *aoxB* internal fragment by inverse PCR led to the determination of 3689 bp encompassing *aoxB* gene (Fig. S3).

The deduced amino acid sequence (841 amino acids) of *aoxB* displayed 64.5% identity (66.9% similarity), 63.3% identity (65.9% similarity), 45% identity (72.4% similarity) and 44.7% identity (73% similarity) with AoxB from *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2003), *Al. faecalis* (Silver and Phung, 2005), *Rhizobium* sp. str. NT-26 (Santini and vanden Hoven, 2004) and *Agrobacterium tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006) respectively. The [3Fe-4S] cluster-binding motif (C-X₂-C-X₃-C-X₁₀-S) is present as well as the residues (H₁₀₆, E₂₀₄, R₄₂₀ and H₄₂₄) which are predicted to bind the As(III) (Ellis *et al.*, 2001). Most of the residues interacting with the molybdenum cofactor are also conserved (Ellis *et al.*, 2001). Immediately upstream from *aoxB* is the *aoxA* gene encoding the arsenite oxidase small subunit. The predicted AoxA (179 amino acids) has a 33-amino-acid predicted Tat signal sequence with the characteristic SRRIFLK motif (Barks, 1996). The mature protein displayed 61.6% identity (88.4% similarity), 60.3% identity (80% similarity), 44.5% identity (69.2% similarity) and 43.8% (69.2% similarity) with the arsenite oxidase small subunit from *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2003), *Al. faecalis* (Silver and Phung, 2005), *Rhizobium* sp. str. NT-26 (Santini and vanden Hoven, 2004) and *Ag. tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006) respectively. The residues coordinating the [2Fe-2S] Rieske cluster (C-X-H-X₁₅-C-X₂-H) are conserved. As in all known arsenite oxidases, this motive reads C-X-H-M-G, with the methionine residue never occurring in Rieske protein from *bc₁* complexes (Lebrun *et al.*, 2003). The similarities of the arsenite

oxidase subunits from *Thiomonas* 3As were greater with AoxA and AoxB from β- (*H. arsenicoxydans* and *Al. faecalis*) than α- (*Rhizobium* sp. str. NT-26 and *Ag. tumefaciens*) *Proteobacteria*. This is in agreement with the 16S rRNA gene phylogeny, and not according to the carbon source used by the microorganism (autotrophic/heterotrophic) as suggested recently (Rhine *et al.*, 2007) as the only autotrophs are *Thiomonas* 3As and *Rhizobium* sp. str. NT-26, each one belonging to a different subgroup of the *Proteobacteria*. Downstream from *aoxB*, there is a carboxy-terminal truncated open reading frame (ORF) with a Sec signal sequence and with the C-X₂-C-H motif characteristic of cytochromes *c*. The putative mature cytochrome presents 63% identity (78.3% similarity) to the cytochrome *c*_{251/c₂₅₂ subunit SoxD of the sulfite oxidase from *Hydrogenophikis thermoluteolus* across 46 predicted amino acids, 56.5% identity (64.8% similarity) to the putative cytochrome *c*_{251/c}₂₅₂ from *Leptospirillum* sp. group II across 46 predicted amino acids, 56.5% identity (80.4% similarity) across 46 inferred amino acids to the cytochrome *c*₂₅₁ from *Pseudomonas aeruginosa* and 58.7% identity (76.9% similarity) across 47 predicted amino acids to the cytochrome *c*₂ from *Rhodocyclops tenuis*. Interestingly, 14 out of 20 residues are identical and 17 similar to the amino-terminal sequence of the *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14 cytochrome *c* that was shown to be the physiological partner of the arsenite oxidase (vanden Hoven and Santini, 2004). Of particular note, this putative partial mature cytochrome shows low similarity to the cytochrome *c* encoded by the known arsenite oxidase operons: it is only 36.7% identical (71.4% similar) across 49 predicted amino acids to the AoxD cytochrome *c* from *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2003), 22.9% identical (47.9% similar) across 48 predicted amino acids to the Cyt *c*₂ from *Ag. tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006) and 19.5% identical (37.9% similarity) across 87 predicted amino acids to the CytC cytochrome *c* from *Rhizobium* sp. str. NT-26 (Santini *et al.*, 2007).}

Upstream from *aoxA*, no obvious ORF, or -10 and -35 regions characteristic of the *Escherichia coli* σ70 RNA polymerase were detected.

Evidence of the *aox* operon and its regulation

The length of the *aoxA-aoxB* intergenic region (27 bp) indicates that these two genes are likely co-transcribed. Furthermore, transcriptional regulation of *aoxAB* in the presence of As(III) was suggested from the enzymatic activity measurements (see above). To test these hypothesis, the *aoxB* transcripts were studied by Northern blot hybridization on total RNAs from *Thiomonas* 3As grown in the presence and in the absence of As(III) with antisense RNA probes complementary to the *aoxB* gene. More *aoxB* transcripts were detected in the presence than in the

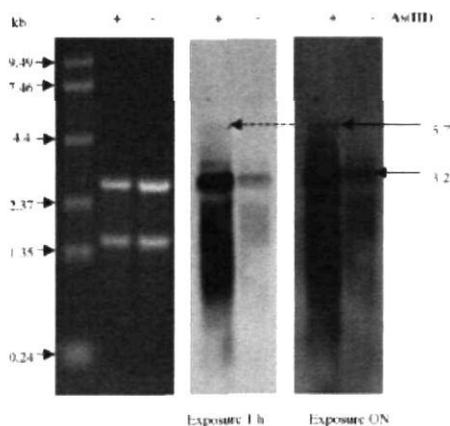


Fig. 3. Detection of *aoxB* transcript in *Thiomonas* 3As. Antisense *aoxB* RNA probes were hybridized with total RNA extracted from *Thiomonas* 3As cells grown in the presence (+) and in the absence (-) of As(III). The left panel shows the ethidium bromide-stained gel with the RNA molecular weight marker from Invitrogen. The middle panel is after 1 h exposure and the right panel after overnight (ON) exposure. The arrows indicate the larger (5.7 kb) and the main (3.2 kb) transcripts.

absence of As(III) in agreement with the transcriptional regulation of this gene (Fig. 3). The largest transcript detected was 5700 nucleotides in length. The *aoxB* gene being 2526 nucleotide long, it belongs therefore to a polycistronic unit. The major band detected is 3200 nucleotides, suggesting the processing of the larger transcripts.

The genetic organization *aoxAB*, with the small Rieske subunit gene upstream from that of the catalytic molybdopterin subunit, is conserved in all the arsenite-oxidizing prokaryotes analysed to date, while no obvious conservation was observed in the ORFs flanking these two genes. However, in *Ag. tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006), as in *Thiomonas* 3As (this paper), the *aoxAB* genes have been shown to be co-transcribed with the downstream gene. Interestingly, in these two bacteria, this gene encodes a cytochrome *c*. If indeed, this gene is co-transcribed with *aoxAB*, this cytochrome is likely to be the physiological electron partner of the arsenite oxidase in *Thiomonas* 3As, the electron pathway being: As(III) → Mo (AoxB) → [3Fe-4S] (AoxB) → [2Fe-2S] (AoxA) → Haem C (cytochrome *c*) → O₂.

Experimental procedures

Strains, plasmids and growth conditions

Strain TG1 [*supE* *hedΔ5* *thiΔ* (*lac-proAB*) F': *traD36* *proAB* *lacP* *lacZΔM15*] of *E. coli* was used for phagemid propagation, and

Journal compilation © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, *Environmental Microbiology*
No claim to original French government works

was grown at 37°C on Luria broth (LB) medium (Ausubel *et al.*, 1998). The phagemid SK⁺ Bluescript was purchased from Stratagene.

The sample collected from the Reigous spring was inoculated at 30°C with vigorous shaking on 9K basal salts medium [(NH₄)₂SO₄: 0.2 g l⁻¹; K₂HPO₄: 3 g l⁻¹; MgSO₄·7H₂O: 0.5 g l⁻¹; CaCl₂·2H₂O: 0.16 g l⁻¹; adjusted to pH 3 with H₂SO₄] sterilized by autoclaving supplemented with 200 mg l⁻¹ NaAsO₂. *Thiomonas* 3As was grown at 30°C with vigorous shaking on CSM6 medium adapted from Battaglia-Brunet and colleagues (2002). It consists of 50% solution A [K₂HPO₄: 1 g l⁻¹; KH₂PO₄: 1 g l⁻¹; NaCl: 1 g l⁻¹; (NH₄)₂SO₄: 0.4 g l⁻¹; adjusted to pH 6 with H₂SO₄]; 50% solution B (CaCl₂·2H₂O: 0.2 g l⁻¹; MgSO₄·7H₂O: 0.2 g l⁻¹), 10 mM sodium thiosulfate; 0.05% (w/v) yeast extract. Where necessary, 200 mg l⁻¹ NaAsO₂ was added. Solutions A and B, and NaAsO₂ were sterilized by autoclaving. Yeast extract and thiosulfate solutions were sterilized three times by autoclaving, filtered through a 0.22 μm Millipore membrane, aliquoted and stored at -20°C. The solid medium used for *Thiomonas* 3As was the mating medium described in Liu and colleagues (2001).

Cellular growth was followed either by determining optical density at 600 nm (OD₆₀₀) or by direct cell counting in a Neubauer chamber.

Isolation of arsenite-oxidizing bacteria

Arsenite-oxidizing bacteria were looked for by subculturing a sample from the Reigous spring where soluble arsenic was disappearing (Casiot *et al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2003) in modified 9K (pH 3) liquid medium, in which the only energy source available was As(III). Subcultures were repeated each month for 1 year. As(III) oxidation to As(V) was monitored occasionally using the silver nitrate colorimetric assay (Simeonova *et al.*, 2004). After the 1-year period, soluble total arsenic, As(III) and As(V) concentrations were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (Guerin *et al.*, 1997). An aliquot of this subculture was spread on the mating solid medium (Liu *et al.*, 2001) supplemented with As(III). After growth, the two morphologically distinct bacteria were isolated on the same solid medium. Once isolated, each one was inoculated on As(III) 9K synthetic medium to test their ability to grow on As(III). When growth was observed, As(III) oxidation was followed by removing aliquots at regular intervals during the growth and determining the soluble total arsenic, As(II) and As(V) concentration by ICP-MS (Guerin *et al.*, 1997) as previously described (Duquesne *et al.*, 2003). The experiments were performed in triplicate from independent cultures. The variation between the values obtained in the three independent experiments never exceeded 5%.

Measurement of arsenite oxidase activity

Bacteria grown to late log phase in CSM-0.05% yeast extract pH 6, with or without As(III) 200 mg l⁻¹, were harvested by centrifugation at 15 000 g for 15 min at 4°C, washed once in 50 mM MES pH 6 and re-suspended in 5 ml g wet cell⁻¹ 50 mM MES pH 6 supplemented with the complete protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were disrupted by a double passage through a French press. Unbroken cells were removed by centrifugation at 15 000 g for 20 min at 4°C.

6 K. Duquesne et al.

Supernatant (crude extracts) was centrifuged at 150 000 *g* for 1 h 30 at 4°C. The pellet re-suspended in 50 mM MES pH 6 constitutes the membrane fraction while the supernatant represents the soluble fraction.

Arsenite oxidase activity was determined by following the transfer of reducing equivalents from As(III) 200 μ M to 60 μ M 2,4-dichlorophenolindophenol (DCPIP) in 50 mM MES (pH 6) with 2 mM phenazine methosulfate (PMS) according to Anderson and colleagues (1992). The protein concentration was estimated by the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay) after hydrolysis of the cells in 0.4 N NaOH at 100°C for 10 min. Bovine serum albumin was used as the standard.

Detection of arsenite oxidase on native polyacrylamide gel

Crude cell extracts, soluble and membrane fractions corresponding to 15 μ g of total proteins were run on native 6% polyacrylamide gel containing 0.1% Triton X-100. The gel was then equilibrated in 50 mM MES pH 6 for 15 min and stained in the same buffer supplemented with 0.4 mM PMS and 300 mM DCPIP for 30 min in the dark. Addition of 50 μ M sodium arsenite allowed the detection of arsenite oxidase where destaining of the gel was observed.

DNA preparation

Genomic DNA from the subculture was prepared with the Nucleo-Spin Tissue kit from Macherey-Nagel. *Thiomanas* 3As genomic DNA was prepared according the CTAB procedure (Ausubel et al., 1998).

Plasmid DNA was prepared with the Wizard™ Plus Mini-prep DNA purification system.

G+C content, DNA–DNA hybridization, quinones and fatty acid analysis

Thiomanas 3As biomass was produced in a 10 l fermentor in CSM medium pH 6 supplemented with yeast extract 0.05% and thiosulfate 10 mM. Approximately 4 g of wet cells were sent to the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) for G+C content, DNA–DNA hybridization, quinones and fatty acid analyses. Genomic DNA was purified on hydroxyapatite (Cashion et al., 1977). For G+C content determination, genomic DNA was enzymatically digested and the resulting nucleotides were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to Masbah and colleagues (1989). DNA–DNA hybridization was carried out as described by De Ley and colleagues (1970) with the modifications given by Huss and colleagues (1983) using a model Cary 100 Bio UV/VIS spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6 x 6 multicell changer and a temperature controller with *in situ* temperature probe (Varian). Analysis of respiratory quinones were carried out by the Identification Service and Dr Brian Tindall (DSMZ, Braunschweig, Germany). Cellular fatty acid composition was determined by gas chromatography (Agilent Technologies) on extracted microbial fatty acid methyl esters and analysed with the Sherlock MIS software.

Partial 16S rDNA amplification and sequencing

Polymerase chain reaction amplification was performed on genomic DNA extracted from the subculture with universal eubacteria 16S rRNA gene primers D1 and P2 (Duquesne et al., 2003) derived from the fD1 and rP2 dinucleotides designed for most eubacteria (Weisburg et al., 1991). The amplified DNA was cloned into the EcoRV site of the Bluescript SK⁺ vector from Stratagene. The insert of about 30 clones has been sequenced.

DNA sequencing and analysis

Sequences were determined by automated multicapillary electrophoresis at Genome Express (Meylan, France). The DNA sequences were compiled, analysed and compared with the EMBL database sequences with CAP3 (Huang and Madan, 1999), BLAST (Altschul and Gish, 1996), CLUSTALW (Combet et al., 2000).

Phylogenetic analysis

Essentially complete sequence of the 16S rRNA gene was determined for both *Thiomanas* 3As (1442 bp) and *Burkholderia* 2As (1284 bp). The 16S rRNA gene sequence of *Thiomanas* 3As was aligned with the corresponding sequences of the *Thiomanas* strains which gave the highest score with BLASTN [*Thiomanas* B1 (AJ549218), *Thiomanas* B2 (AJ549219), *Thiomanas* B3 (AJ549220), *Thiomanas* Ymys1 (AF387302), *Thiomanas* Ymys3 (AF387303), *Thiomanas* ML2-94 (DQ148145), *Thiomanas* SC-6 (AB255086) and *Thiomanas* WM43 (DQ415765)], *Thiomanas* type species [*Tm. intermedia* ATCC15466 (AY455809), *Tm. perometabolis* ATCC23370 (AY455808), *Tm. thermosulfata* ATCC51520 (U27839), *Tm. cuprina* DSM5495 (U67162), *Tm. arsenivorans* b6 (AY950676)], *Acidithiobacillus* type species [*A. ferrooxidans* ATCC 23270 (AJ278718), *A. thiooxidans* ATCC 19377 (Y11596), *A. caldus* DSM 8584 (Z29975)] and, as the outgroup, *E. coli* K-12 (EO5133). The 16S rRNA gene sequence of *Burkholderia* 2As was aligned with the corresponding sequences which gave the highest score with BLASTN [uncultured bacterium clone WIM13.6 (DQ202245.1), *Burkholderia* DM-Ni2 (DQ419959.1), *Burkholderia* DM-Co2 (DQ419956.1), *Burkholderia* Cd1 (DQ419952.1), two *Burkholderia* phenazine strains (U96936.1 and AB021394, the last one corresponding to the type strain)], with two *Thiomanas* bacteria [*Tm. cuprina* DSM5495 (U67162) and *Tm. thermosulfata* ATCC51520 (U27839)] and, as an outgroup, *A. ferrooxidans* ATCC23270 (AJ278718). Phylogenetic analyses were performed with the CLUSTALX program (Thompson et al., 1997) with the nucleotides that were unambiguous. Bootstrap analysis of 100 data was carried out to determine the statistical confidence of the branching points in the tree.

Sequencing of cbbL and cbbS genes

Oligonucleotides cbbL-TIF, cbbL-TIR, cbbS-TIS and cbbS-TIR (Table S2) were designed from the *cbbL* and *cbbS* gene sequences from *Tm. intermedia* (Accession No. AF046933) (Cannon et al., 2003), which is the closest derivative from

Thiomonas 3As from which *cbbL* and *cbbS* nucleotide sequences have been determined. A fragment of the expected size was obtained by PCR (1422 bp for *cbbL* and 330 bp for *cbbS*). The PCR fragment corresponding to *cbbS* has been completely sequenced with *cbbS*-TIF and *cbbS*-TIR. The PCR fragment corresponding to *cbbL* has been partly sequenced with *cbbL*-TIF and *cbbL*-TIR. From the sequence obtained, two other oligonucleotides were designed, *cbbL*-TMF and *cbbL*-TMR (Table S2), and used to complete the *cbbL* sequence.

Sequencing of the *aoxAB* genes by DOP-PCR and inverse PCR

Four degenerate oligonucleotides able to form four pairs of convergent primers were designed on the basis of conserved regions of the amino acid sequence of the large subunit of the arsenite oxidase from *A. faecalis* (Silver and Phung, 2005), *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2003) and *A. permix*. In a 50 µl reaction, 1 pmol of each degenerate primer, *Aox1*(Deg) and *Aox6*(Deg) (Table S2), was used and the PCR amplifications were carried out with 1 U *Taq* polymerase (Roche) as follows: 2.5 min at 84°C, 30 cycles: 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and 72°C for 1 min and finally 4 min at 72°C. The 1200 bp fragment was recovered, purified using Wizard PCR Preps (Promega), and cloned into the *EcoRV* site of the phagemid Bluescript SK⁺ to give the SK-*aoxB* plasmid. Ligation products were used to transform *E. coli* strain TG1. White Ap^r clones were selected on LB-Ap-Xgal-IPTG plates. The insert was amplified by PCR and sequenced with the universal primers T3 and T7.

Amplification of flanking sequences was performed by inverse PCR as already described (Ochman *et al.*, 1990). Briefly, *Thiomonas* 3As genomic DNA was digested with *Bst*YI, *Hae*III, *Hinc*II, *Sac*I and *Sac*II restriction enzymes (Biolabs). Polymerase chain reaction was realized with the religated DNA as matrix using the divergent oligonucleotides deduced from the sequence determined (Table S2).

RNA manipulations

Thiomonas 3As total RNAs extraction and Northern blotting protocols have been described in Guillani and colleagues (1997) and in Appia-Ayme and colleagues (1999) respectively. The DIG-labelled RNA probes hybridizing to *aoxB* transcripts were obtained from the SK-*aoxB* plasmid described in the DOP-PCR section above. Following linearization of this plasmid with *Hind*III, *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase was performed in the presence of DIG-11-UTP with the DIG RNA labelling Kit (Roche). Pre-hybridization and hybridization with the DIG-labelled probe were performed under stringent conditions according to the recommendations of Roche. RNA was detected by a chemiluminescent reaction with disodium 3-(4-methoxyxyloxy) [1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{1'}]] decan-4-yl)phenyl phosphate (CSPD) as recommended by Roche.

Transmission electron microscopy

Cells were grown in 10 ml of CSM6 medium for 2 days, harvested by centrifugation and re-suspended in 500 µl of

Arsenite oxidation by *Thiomonas* sp. 7

CSM6. Aliquots (10 µl) were applied onto formvar, carbon-coated freshly ionized grids for 1 min then stained with 1% uranyl acetate. Samples were viewed on a Zeiss EM 9 transmission electron microscope operating at an accelerating voltage of 80 kV.

Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in culture medium (CSM medium pH 6 supplemented with yeast extract 0.01% and 1 mM thiosulfate) for 2 h at 4°C. After being washed with PBS, they were post-fixed in 2% OsO₄ in PBS for 1 h at room temperature, and then dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Epon 812. Thin sections (0.06 µm) on grids were stained with uranyl acetate and lead citrate. They were observed with a Zeiss EM 109 electron microscope operating at 80 kV.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences of the 16S rRNA, *aoxAB*, *cbbL* and *cbbS* genes of *Thiomonas* 3As have been submitted to the EMBL/GenBank databases under the Accession No. AM492684, AM502288, AM774405 and AM774404, respectively, the 16S rRNA gene of *Burkholderia* 2As under the Accession No. AM503077.

Acknowledgements

We warmly acknowledge D.B. Johnson (University of Wales, Bangor, UK) for his critical reading of the manuscript. We thank F. Chaspoul from P. Gallice's lab (Laboratoire de Chimie Générale, Faculté de Pharmacie, Marseille, France) for the total arsenic, As(III) and As(V) concentration determination by ICP-MS, A. Bernadac (service d'imagerie cellulaire, IBISM, Marseille, France) for the electron microscopy images. We gratefully acknowledge S. Silver (University of Illinois, Chicago, IL, USA) for the sequence of the arsenite oxidase genes from *A. faecalis* prior to publication. We are indebted to J.M. Shively for his help in carboxysome detection. We acknowledge M. Bauzan (Fermentation plant unit, IBISM, Marseille, France) for growing the bacteria, R.M. Kroppenstedt, P. Schumann, C. Spröer, B. Tindall and S. Verburg from DSMZ (Braunschweig, Germany), for their help in taxonomic analyses. This work was supported by the CNRS and the French Ministry of Research (Programme Environnement-Vie et Société, ACI-Ecologie Quantitative, ACI-ECODYN), by the CNRS-INSU (Programme GEOMEX). Part of this work was financed by the EU framework 6 project 'BIOMINE' (No. NM2.ct., 2005.500329). K.D. and A.L. acknowledge the support from the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie and the Bureau de Recherches Géologiques et Minières. This work was partly performed in the frame of the Groupement de Recherche 'Métabolisme de l'Arsenic chez les Prokaryotes: de la résistance à la détoxification' (GDR2909-CNRS).

References

- Altschul, S.F., and Gish, W. (1996) Local alignment statistics. *Methods Enzymol* 266: 460–480.
- Amaral Zettler, L.A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R., and Sogin, M.L. (2002) Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature* 417: 137.

8 K. Duquesne et al.

- Anderson, G.L., Williams, J., and Hille, R. (1992) The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem* 267: 23674–23682.
- Appia-Ayme, C., Guilian, N., Flatochniak, J., and Bonnefoy, V. (1999) Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa₃-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl Environ Microbiol* 65: 4781–4787.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, USA: Greene Publishing.
- Baker, B.J., and Banfield, J.F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 139–152.
- Baker, B.J., Lutz, M.A., Dawson, S.C., Bond, P.L., and Banfield, J.F. (2004) Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainages. *Appl Environ Microbiol* 70: 6264–6271.
- Battaglia-Brunet, F., Dictor, M.C., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser, K., et al. (2002) An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J Appl Microbiol* 93: 656–667.
- Battaglia-Brunet, F., Joulian, C., Garrido, F., Dictor, M.C., Morin, D., Coupland, K., et al. (2005) Oxidation of arsenite by *Thiomanas* strains and characterization of *Thiomanas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89: 1–10.
- Berks, B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 22: 393–404.
- Bond, P.L., Druschel, G.K., and Banfield, J.F. (2000) Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 66: 4962–4971.
- Bruneel, O., Personné, J.C., Casiot, C., Leblanc, M., Eibaz-Poulchet, F., Mahler, B.J., et al. (2003) Mediation of arsenic oxidation by *Thiomanas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J Appl Microbiol* 95: 492–499.
- Cannon, G.C., Baker, S.H., Soyer, F., Johnson, D.R., Bradburne, C.E., Mehlman, J.L., et al. (2003) Organization of carboxysome genes in the Thiobacilli. *Curr Microbiol* 46: 115–119.
- Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J., and Franklin, M. (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* 81: 461–466.
- Casiot, C., Morin, G., Julliot, F., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M., et al. (2003) Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Res* 37: 2929–2936.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deléage, G. (2000) NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* 3: 147–150.
- Coupland, K., Battaglia-Brunet, F., Hallberg, K.B., Dictor, M.C., Garrido, F., and Johnson, D.B. (2003) Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role for novel *Thiomanas* spp. In *Biohydrometallurgy; a Sustainable Technology in Evolution*. Tsezos, M., Hatzikioeeylan, A., and Remoudaki, E. (eds). Athens, Greece: National Technical University of Athens, Zografou, Greece, pp. 639–646.
- De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A. (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 12: 193–194.
- Duquesne, K., Lebrun, S., Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J.C., Leblanc, M., et al. (2003) Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol* 69: 6165–6173.
- Duquesne, K. (2004) Rôle des bactéries dans la bioremédiation de l'arsenic dans les eaux acides de drainage de la mine de Carnoulès. PhD Thesis. Marseille, France: Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II.
- Ehrlich, H.L. (2002) Bacterial oxidation of As(III) compounds. In *Environmental Chemistry of Arsenic*. Frankenberger, J.W.T. (ed.). New York, USA: Marcel Dekker, pp. 313–328.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R., and Kuhn, P. (2001) Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9: 125–132.
- Gonzalez-Toril, E., Lobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., and Amils, R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol* 69: 4853–4865.
- Guerin, T., Astruc, M., Batsel, A., and Borsler, M. (1997) Multielemental speciation of As, Se, Sb and Te by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 44: 2201–2208.
- Guilian, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M., and Bonnefoy, V. (1997) Alanyl-tRNA synthetase genes of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* 143: 2179–2187.
- Hallberg, K.B., and Johnson, D.B. (2003) Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy* 71: 139–148.
- vanden Hoven, R.N., and Santini, J.M. (2004) Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim Biophys Acta* 1656: 148–155.
- Huang, X., and Madan, A. (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9: 868–877.
- Huss, V.A.R., Festl, H., and Schleifer, K.H. (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* 4: 184–192.
- Inskip, W.P., Macur, R.E., Hamamura, N., Wareslow, T.P., Ward, S.A., and Santini, J.M. (2007) Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ Microbiol* 9: 934–943.
- Johnson, D.B., and Hallberg, K.B. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* 154: 466–473.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J., and McDermott, T.R. (2006) Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 188: 1081–1088.
- Katayama, Y., Uchino, Y., Wood, A.P., and Kelly, D.P. (2006) Confirmation of *Thiomanas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomanas* Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2553–2557.
- Lebrun, E., Brugna, M., Baymann, F., Müller, D., Lievrement,

Arsenite oxidation by *Thiomonas* sp. 9

- D., Lett, M.C., and Nitschke, W. (2003) Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol Biol Evol* 20: 686–693.
- Liu, Z., Bome, F., Ratouchniak, J., and Bonnefoy, V. (2001) Genetic transfer of IncP, IncQ and IncW plasmids to four *Thiobacillus ferrooxidans* strain by conjugation. *Hydrometallurgy* 59: 339–345.
- Lopez-Archilla, A.I., Gerard, E., Moreira, D., and Lopez-Garcia, P. (2004) Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiol Lett* 235: 221–228.
- Lopez-Archilla, A.I., Marin, I., and Amils, R. (2001) Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microb Ecol* 41: 20–35.
- Macalady, J.L., Lyon, E.H., Koffman, B., Abertson, L.K., Meyer, K., Galdenzi, S., and Mariani, S. (2006) Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Appl Environ Microbiol* 72: 5596–5609.
- Mesbah, M., Premachandran, U., and Whitman, W. (1989) Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39: 159–167.
- Moreira, D., and Amils, R. (1997) Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 522–528.
- Muller, D., Livremont, D., Simeonova, D.D., Hubert, J.C., and Lett, M.C. (2003) Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant *Beta-proteobacterium*. *J Bacteriol* 185: 135–141.
- Ochman, H., Medhora, M.M., Garza, D., and Hartl, D.L. (1990) Amplification of flanking sequences by inverse PCR. In *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds). London, UK: Academic Press, pp. 219–227.
- Oremland, R.S., and Stolz, J.F. (2003) The ecology of arsenic. *Science* 300: 939–944.
- Philips, S.E., and Taylor, M.L. (1976) Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl Environ Microbiol* 32: 392–399.
- Rhine, E.D., Ni Chadhain, S.M., Zylstra, G.J., and Young, L.Y. (2007) The arsenite oxidase genes (*aroAB*) in novel chemolithoautotrophic arsenite oxidizers. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 662–667.
- Salmassi, T.M., Venkateswaren, K., Satomi, M., Nealson, K.H., Newman, D.K., and Hering, J.G. (2002) Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertmagnii*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol J* 19: 53–66.
- Santini, J.M., and vanden Hoven, R.N. (2004) Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J Bacteriol* 186: 1614–1619.
- Santini, J.M., Sty, L.I., Schnagl, R.D., and Macy, J.M. (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol* 66: 92–97.
- Santini, J.M., Kappler, U., Ward, S.A., Honeychurch, M.J., vanden Hoven, R.N., and Bernhardt, P.V. (2007) The NT-26 cytochrome *c₂₂* and its role in arsenite oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1767: 189–196.
- Shively, J.M., English, R.S., Baker, S.H., and Cannon, G.C. (2001) Carbon cycling: the prokaryotic contribution. *Curr Opin Microbiol* 4: 301–306.
- Silver, S., and Phung, L.T. (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* 71: 599–608.
- Simeonova, D.D., Livremont, D., Lagarde, F., Muller, D.A., Groudeva, V.I., and Lett, M.C. (2004) Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 237: 249–253.
- Stolz, J.F., Basu, P., Santini, J.M., and Oremland, R.S. (2006) Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol* 60: 107–130.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876–4882.
- Van Doren, S.R., Yun, C.H., Crofts, A.R., and Gennis, R.B. (1993) Assembly of the Rieske iron-sulfur subunit of the cytochrome *bc₁* complex in the *Escherichia coli* and *Rhodobacter sphaeroides* membranes independent of the cytochrome *b* and *c* subunits. *Biochemistry* 32: 628–636.
- Weegee, W., Livremont, D., Perret, M., Lagarde, F., Hubert, J.C., Leroy, M., and Lett, M.C. (1999) Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometa* 12: 141–149.
- Weisburg, W.G., Bame, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697–703.

Supplementary materials

The following supplementary material is available for this article online:

- Fig. S1. Phylogenetic tree of the '3As' and '2As' isolates. In the left panel, phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA gene sequences of '3As', *Thiomonas* and *Acidithiobacillus* species with *Escherichia coli* as an outgroup species. The analysis included data from 1350 unambiguous nucleotide positions. In the right panel, phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequences of '2As', *Burkholderia* and *Thiomonas* species with *A. ferrooxidans* as an outgroup species. The analysis included data from 1284 unambiguous nucleotide positions. Bootstrap values are based on 100 runs. The branch lengths are indicated. Type strains are indicated with a †. The scale bar represents changes per nucleotide.
- Fig. S2. Electron micrograph of *Thiomonas* 3As. A. Entire cells grown on CSM medium pH 6 supplemented with yeast extract 0.05% and thiosulfate 10 mM. B. Thin sections of *Thiomonas* 3As cells grown on CSM medium pH 6 supplemented with yeast extract 0.01% and 1 mM thiosulfate showing a typical carboxysome.
- Fig. S3. Nucleotide sequence of the *aoxAB* region from *Thiomonas* 3As. The ribosome binding site is in italics. The Tet signal sequence of AoxA is underlined and the Sec signal sequence of the putative cytochrome *c* is double underlined. The residues coordinating the [2Fe-2S] cluster in AoxA are denoted by a star (*). The two Cys residues involved in a disulfide bridge in AoxA are denoted by a plus (+). The res-

10 *K. Duquesne et al.*

Residues coordinating the [3Fe-4S] cluster in AoxB are denoted by a dollar (\$). The residues binding the molybdenum cofactor in AoxB are in bold faces. Those predicted to bind the As(III) are indicated with an exclamation mark (!). The haem C binding site is indicated by the symbol §.

Table S1. Fatty acid composition of *Thiomonas* 3As.

Table S2. Oligonucleotides used in this study

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>



Géosciences pour une Terre durable

brgm

Centre scientifique et technique
3, avenue Claude-Guillemin
BP 6009
45060 – Orléans Cedex 2 – France
Tél. : 02 38 64 34 34

Service géologique régional "région"
Adresse
Adresse
Code postal – Ville - France
Tél. :