

PROJET DE RECHERCHE DÉTAILLÉ

Oxydation bactérienne de l'arsenic et du soufre : déchiffrement des connexions entre ces métabolismes pour la mise en place de traitements biologiques efficaces d'eaux polluées

L'élimination de l'arsenic des milieux pollués notamment aqueux (eaux usagées, potables ou effluents industriels) est actuellement un enjeu mondial. L'origine de l'arsenic peut être diverse mais est très largement celle de l'activité industrielle et agricole des Hommes, en région SUD comme ailleurs. A côté de l'utilisation de l'arsenic comme produit phytosanitaire, l'arsenic provient des industries chimiques et minières, parmi lesquelles Altéo (Gardanne), Lyondell Chimie (Fos sur Mer), Esso (Fos sur Mer), Naphtachimie (Martigues), Eurenco France (Sorgues) et Socatri (Bollène) dans la région SUD. Cet arsenic se rencontre sous deux formes oxy-anioniques : arsénite (sa forme réduite notée As(III)) et arséniate (sa forme oxydée, As(V)). Les procédés classiques d'élimination comprennent une étape d'oxydation étant donné que l'arséniate est plus facile à complexer (notamment avec des oxyhydroxydes de fer), et donc à éliminer, et est lui-même moins toxique que l'arsénite. Les procédés chimiques classiques, qui utilisent des réactifs oxydants (peroxyde d'hydrogène, hypochlorite de sodium, ozone, permanganate de potassium, dioxyde de manganèse, etc.), ont non seulement un coût élevé mais sont générateurs de sous-produits eux même toxiques. Plusieurs équipes, de par le monde, travaillent donc à mettre au point des méthodes de bio-remédiation, présentant de plus l'avantage de pouvoir traiter en même temps d'autres polluants, par exemple le soufre.

Le laboratoire BIP-UMR 7281, spécialisé dans l'étude du métabolisme énergétique de micro-organismes extrémophiles par des approches multidisciplinaires, travaille depuis plusieurs années sur deux bactéries modèles : *Aquifex (A.) aeolicus* et *Halorhodospira (H.) halophila*. Ces deux bactéries ont été montrées, par le laboratoire, capables de métaboliser l'arsenic et le soufre. Mais le détail de ces métabolismes n'est pas entièrement connu et en particulier des faisceaux de données suggèrent que ces deux métabolismes soient liés. Il a en effet été suggéré non seulement que certaines enzymes « classiques » du soufre pourraient convertir l'arsenic mais également que certains organismes dont *H. halophila* ne métaboliseraient l'arsenic que si celui-ci a été préalablement soufré. Le **décryptage des deux métabolismes** associera des approches de microbiologie à des études fonctionnelles : 1) par suivi des substrats consommés et produits formés lors de la croissance bactérienne en conditions soufrées et/ou arséniées, 2) par suivi des protéines produites lors de ces mêmes croissances et 3) par étude enzymologique des enzymes établies être impliquées. Ce travail s'avère indispensable au développement rationnel de procédés biologiques de dépollution. C'est le projet de recherche que nous proposons, en lien avec la Société GERME, qui a pour spécialité la sélection, la mise en œuvre et le contrôle des microorganismes dans l'environnement, l'agriculture et l'industrie, ouvrant ainsi la possibilité de pouvoir proposer des solutions techniques innovantes à des problèmes écologiques ou industriels. En vue d'un développement industriel par la société GERME, une partie des expériences pourra être menée en collaboration avec cette société. Cette partie du travail est développée spécifiquement dans l'Annexe 2.

Suivi des métabolismes de l'arsenic et du soufre-

H. halophila et *A. aeolicus* sont cultivées, au laboratoire, en utilisant différents substrats énergétiques : *H. halophila* croît par oxydation de l'arsenic (arsénite) ainsi que certains composés soufrés (thiosulfate et sulfure notamment) alors qu'*A. aeolicus* est cultivée à l'heure actuelle uniquement par oxydation du thiosulfate, soufre élémentaire ou encore sulfure (en plus de l'hydrogène moléculaire). Si ces cultures se font désormais en routine, d'autres donneurs d'électrons soufrés ou arséniés doivent encore être testés pour la croissance de ces deux bactéries. En particulier, des données bibliographiques indiquent une meilleure croissance de *H. halophila* avec la présence simultanée de sources d'énergie soufrées et arséniées dans le milieu de croissance ou de composés mêlant soufre et arsenic comme le thioarsenic. De plus, le développement d'*A. aeolicus* en présence d'arsenic ou de thioarsenic n'a jusqu'à présent pas été investigué, alors que des bactéries qui lui sont phylogénétiquement proches ont été démontrées croître par oxydation d'arsénite mais aussi de monothioarseniate (Aguilar et al, 2004 ; Härtig et al, 2014). Il conviendra donc, dans le cadre de ce projet, d'étudier la capacité des souches modèles à utiliser des donneurs d'électrons soufrés ou arséniés ou les deux et donc de cultiver ces souches dans de nouvelles conditions de croissance. Ces études microbiologiques seront couplées à une analyse des conversions du soufre et de l'arsenic par les bactéries en cours de croissance, par la quantification des substrats et produits du métabolisme dans le milieu de culture par HPLC (pour les composés du soufre) ou par ICP-MS (qui permet de séparer et doser spécifiquement As(III) et as(V)) ou encore par dosages colorimétriques.

Détermination des enzymes clés de ces métabolismes-

Le métabolisme microbien d'oxydation des composés soufrés est très complexe (Dahl, 2017), puisqu'il implique plusieurs étapes d'oxydation successives du substrat énergétique faisant intervenir différents intermédiaires soufrés et donc plusieurs enzymes spécifiques de chacun de ces intermédiaires. De plus, il a été montré pouvoir être dévié pour la conversion de l'As chez certaines bactéries (Cozen et al, 2009 ; Ahn et al, 2019). Le métabolisme de l'arsenic lui semble moins compliqué, avec une diversité moins importante des enzymes impliquées (van Lis et al, 2013). Cependant les propositions récentes de métabolisme de produits arséniés soufrés laissent penser que l'inventaire des enzymes connues aujourd'hui pour transformer l'arsenic ne serait pas encore complet. Un modèle général de l'oxydation des composés soufrés et/ou arséniés a été proposé par le laboratoire, sur la base d'analyse de la séquence des génomes mais aussi d'études biochimiques, pour les deux bactéries (Figure 1). Parmi toutes ces enzymes, l'Arx est une enzyme réalisant l'oxydation de l'As(III) en As(V) (Szyttenholm et al, 2020 soumis). Est-elle capable de convertir du thioarsénite comme le proposent certains auteurs ? Certaines enzymes du soufre (comme la thiosulfate réductase Phs et la sulfite déshydrogénase Soe (Duval et al, 2008 ; Dahl et al, 2013)) sont très semblables structurellement à l'Arx et appartiennent à la même superfamille d'enzymes. Peut-on envisager que ces enzymes du soufre puissent convertir, *in vivo*, des produits arséniés comme le suggèrent certains auteurs (Cozen et al, 2009 ; Ahn et al, 2019) ou qu'inversement des enzymes de l'arsenic puissent jouer un rôle dans le métabolisme du soufre ?

Le deuxième objectif de ce projet est donc de mettre en évidence le rôle exact de certaines enzymes/protéines potentiellement impliquées dans les métabolismes du soufre et de l'arsenic. Nous associerons pour cela des techniques biochimiques (détermination d'activités enzymatiques sur gels natifs ou en spectrophotométrie, western blot, analyse protéomique) à de la transcriptomique (qRT-PCR), en utilisant les cellules issues des différentes conditions de croissance. L'étude du métabolisme énergétique d'*A. aeolicus* a démarré il y a de nombreuses années au laboratoire et un certain nombre d'enzymes peuvent maintenant être suivies en routine, notamment la sulfite déshydrogénase Soe (Guiral et al, 2012 ; Boughanemi et al, 2016 ; Boughanemi et al, 2020 soumis). L'étude de celles de *H. halophila* a été initiée plus récemment, ce qui a permis notamment d'établir l'implication de l'Arx dans le métabolisme de l'arsenic de cette souche (van Lis

et al, 2013). Mais d'autres enzymes, notamment du métabolisme du soufre sont-elles utiles ? Si oui le sont-elles pour la transformation du substrat arsénié ou pour la génération d'énergie complémentaire nécessaire à la croissance bactérienne ? Parmi les enzymes du soufre identifiées par analyse de génome, quelles sont celles qui interviennent ? Telles sont les premières questions posées.

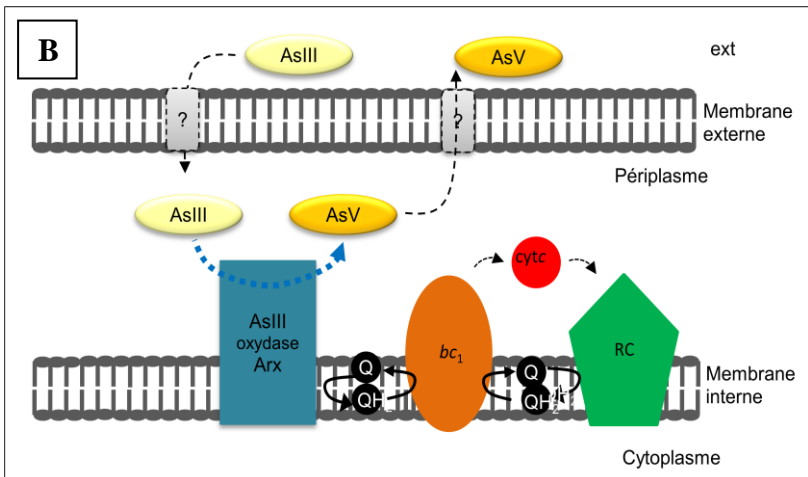
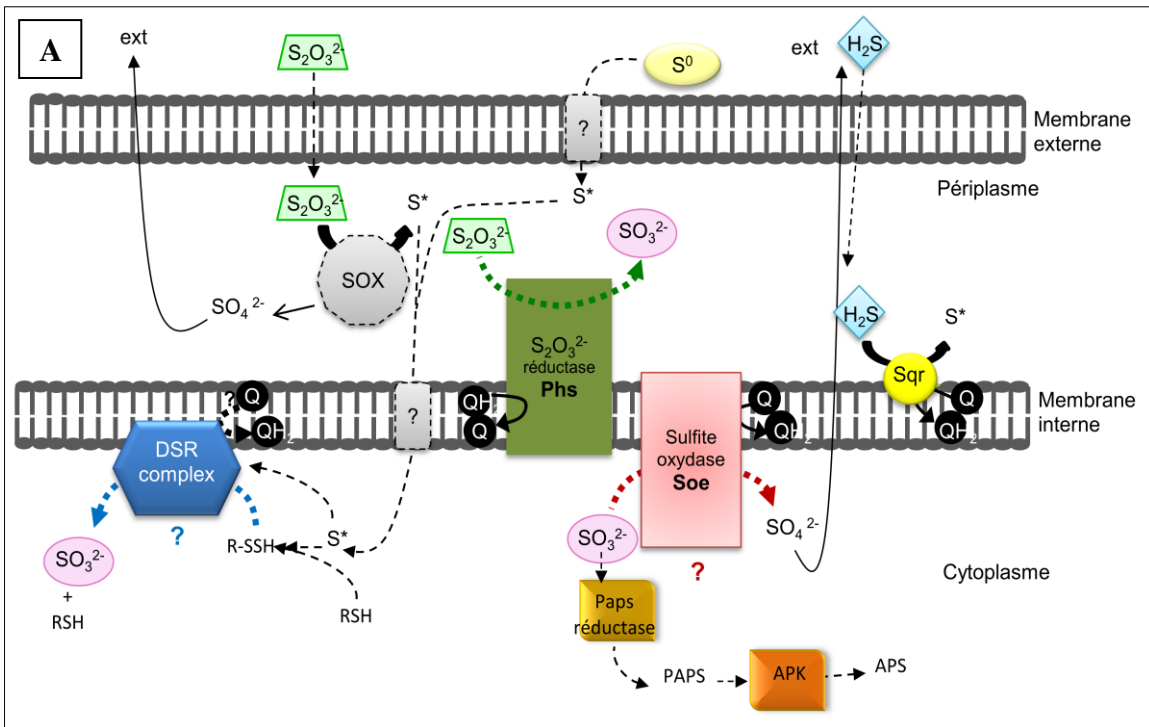
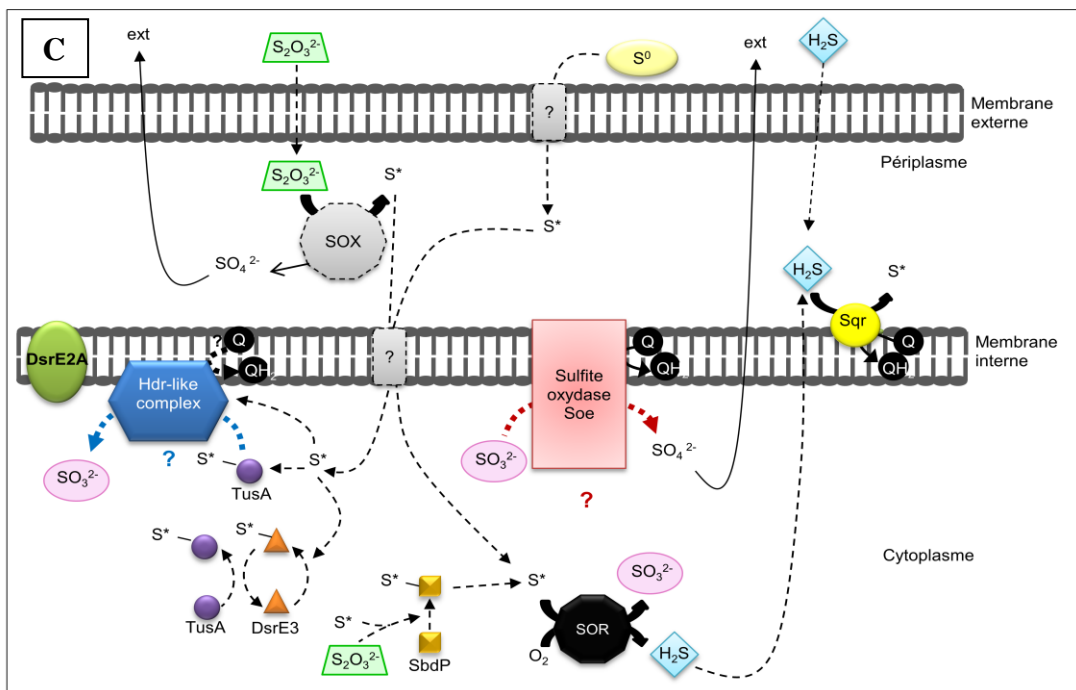


Figure 1

Modèles d'oxydation des composés du soufre et de l'arsenic chez *H. halophila* (A et B) et chez *A. aeolicus* (C).

S* représente une espèce soufrée inconnue. Q est la quinone, S⁰ le soufre élémentaire, SOR la soufre oxygénase réductase, Sqr la sulfure quinone réductase, bc₁ le complexe bc, RC le centre réactionnel photosynthétique.



Etude enzymologique des enzymes impliquées dans ces métabolismes-

Chez *H. halophila*, les deux enzymes du soufre (la thiosulfate réductase Phs et la sulfite déshydrogénase Soe) ont été identifiées par analyse génomique mais non caractérisées. *A. aeolicus* possède une sulfite déshydrogénase de type Soe dont la caractérisation enzymologique a été initiée (Guiral et al, 2005 ; Boughanemi et al, 2020 soumis) (Figure 1). Différentes études suggèrent que certaines enzymes Soe, au moins, puissent, en plus d'oxyder le sulfite, oxyder également l'arsenic *in vivo* (Ahn et al, 2019). Des études enzymologiques complèteront donc les études des voies métaboliques et seront conduites sur les enzymes purifiées afin de déterminer leur spécificité de substrats (soufre/arsenic) in vitro. Les enzymes seront produites de façon hétérologue car difficilement purifiables à partir de l'hôte naturel (surtout concernant *H. halophila*) et/ou directement purifiées à partir des cellules concernant *A. aeolicus*.

L'ensemble de cette étude permettra non seulement une connaissance plus approfondie de métabolismes énergétiques microbiens essentiels mais également de pouvoir envisager des études de dépollution biologique de milieux contaminés à l'aide de ces bactéries.

Références :

- Aguiar P, Beveridge TJ, Reysenbach AL. (2004) *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**(Pt 1): 33-39.
- Ahn AC, Cavalca L, Colombo M, Schuurmans JM, Sorokin DY, Muyzer G. (2019) Transcriptomic Analysis of Two Thioalkalivibrio Species Under Arsenite Stress Revealed a Potential Candidate Gene for an Alternative Arsenite Oxidation Pathway. *Front Microbiol* **10**:1514.
- Boughanemi S, Lyonnet J, Infossi P, Bauzan M, Kosta A, Lignon S, Giudici-Orticoni MT, Guiral M. (2016) Microbial oxidative sulfur metabolism: biochemical evidence of the membrane-bound heterodisulfide reductase-like complex of the bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEMS Microbiol Lett* **363**, fnw156.
- Boughanemi S, Infossi P, Giudici-Orticoni MT, Schoepp-Cothenet B, Guiral M. (2020) The prokaryotic membrane-bound sulfite-oxidizing, quinone-reducing Soe molybdenum enzyme. Soumis
- Cozen AE, Weirauch MT, Pollard KS, Bernick DL, Stuart JM, Lowe TM. (2009) Transcriptional map of respiratory versatility in the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Bacteriol* **191**: 782-794.
- Dahl C, Franz B, Hensen D, Kesselheim A, Zigann R. (2013) Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process. *Microbiology* **159**(Pt 12): 2626-2638.
- Dahl C. (2017) Sulfur Metabolism in Phototrophic Bacteria. In: Hallenbeck P.C., *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Springer International Publishing AG.
- Duval S, Ducluzeau AL, Nitschke W, Schoepp-Cothenet B. (2008) Enzyme phylogenies as markers for the oxidation state of the environment: the case of respiratory arsenate reductase and related enzymes. *BMC Evol Biol* **8**: 206.
- Guiral M, Tron P, Aubert C, Gloter A, Iobbi-Nivol C, Giudici-Orticoni MT. (2005) A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *J Biol Chem* **280**(51): 42004-42015.
- Guiral M, Prunetti L, Aussignargues C, Ciaccafava A, Infossi P, Ilbert M, Lojou E, Giudici-Orticoni MT. (2012) The hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: from respiratory pathways to extremely resistant enzymes and biotechnological applications. *Adv Microb Physiol* **61**: 125-194.
- Härtig C, Lohmayer R, Kolb S, Horn MA, Inskeep WP, Planer-Friedrich B. (2014) Chemolithotrophic growth of the aerobic hyperthermophilic bacterium *Thermocrinis ruber* OC 14/7/2 on monothioarsenate and arsenite. *FEMS Microbiol Ecol* **90**(3): 747-760.
- Szyttenholm J, Chaspoul F, Bauzan M, Ducluzeau A-L, Hajj Chehade M, Pierrel F, Denis Y, Nitschke W, Schoepp-Cothenet B. (2020) The controversy on the ancestral arsenite oxidising enzyme; deducing evolutionary histories with phylogeny and thermodynamics. Soumis
- van Lis R, Nitschke W, Duval S, Schoepp-Cothenet B. (2013) Arsenics as bioenergetic substrates. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 176-188.