



**HAL**  
open science

## Etude de l'évolution du potentiel génétique de populations bactériennes dégradant l'atrazine

Frédérique Changey

► **To cite this version:**

Frédérique Changey. Etude de l'évolution du potentiel génétique de populations bactériennes dégradant l'atrazine. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DI-JOS099 . tel-00806324

**HAL Id: tel-00806324**

**<https://theses.hal.science/tel-00806324>**

Submitted on 29 Mar 2013

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

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



**L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

**INRA-DIJON**

**THESE**

**Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne**  
Discipline : Ecologie Microbienne

Par

Frédérique CHANGEY

Le 16 décembre 2011

**ETUDE DE L'EVOLUTION DU  
POTENTIEL GENETIQUE DE  
POPULATIONS BACTERIENNES  
DEGRADANT L'ATRAZINE**

Directeur de thèse  
Fabrice MARTIN LAURENT

Co-directeur de thèse  
Marion DEVERS-LAMRANI  
Devant le jury composé de :

<b>BATISSON Isabelle</b>	<b>Maître de conférences, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>SIMONET Pascal</b>	<b>Directeur de recherche, Ecole Centrale, Lyon</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>GUZZO Jean</b>	<b>Professeur, Université de Bourgogne, Dijon</b>	<b>Examineur</b>
<b>PESCE Stéphane</b>	<b>Chargé de Recherche, CEMAGREF, Lyon</b>	<b>Examineur</b>
<b>JOUANNEAU Yves</b>	<b>Directeur de Recherche, CNRS, Grenoble</b>	<b>Examineur</b>
<b>DEVERS-LAMRANI Marion</b>	<b>Ingénieur de recherche, INRA, Dijon</b>	<b>Examineur</b>
<b>MARTIN-LAURENT Fabrice</b>	<b>Directeur de Recherche, INRA, Dijon</b>	<b>Examineur</b>



*« Si c'était à refaire, recommenceriez-vous ? dit la chanson ; jamais on ne recommencerait, à moins d'être gâteux ou d'ignorer le goût de l'expérience »*

*Boris Vian*



*Aux utopistes*

*A mon père*



## Remerciements

Je remercie par avance et m'excuse auprès de celles et ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre dans la réalisation de cette thèse.

J'exprime mes remerciements à Philippe Lemanceau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Fabrice, qui a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Je garderai un très bon souvenir des discussions scientifiques qui ont permis de faire progresser le travail et de solutionner les aléas de la paillasse.

Je remercie également Marion, ma co-encadrante de thèse, pour m'avoir parfois botté les fesses et m'avoir appris que l'éparpillement nuit gravement à la thèse. Je la remercie aussi de m'avoir aidée à prendre conscience de l'aspect humain d'une équipe de recherche, sur le tard certes. J'ai été contente de retrouver ce dynamisme que j'apprécie tant à la paillasse et ailleurs.

Je remercie l'ensemble de l'équipe EMGICO, en particulier Laurent Phillipot pour son aide et ses conseils au cours de ma thèse. Merci beaucoup aussi à Nadine, Marie-Christine, Jérémie, David pour leur aide et leur gentillesse.

Je remercie également Dominique et Alain pour les discussions tardives et les conseils précieux tout au long de cette thèse.

Je remercie mes compagnons de galère en thèse ou autres : Aude, Anne-Laure, Farhan (avec un merci supplémentaire pour l'aide bibliographique), Johan, La Loose, Didine, Pierre et tous les autres qui m'ont été d'un grand soutien.

Je remercie aussi l'ensemble des chaleureux permanents de l'INRA pour toujours avoir fait preuve d'une grande gentillesse : merci à Marie-Reine, Colette, Géraldine, Cécile, Amadou, Abdel, Najoi, Nico et les autres.

Je remercie mes parents ainsi que Petro pour m'avoir toujours soutenue malgré un cursus universitaire qui a pu leur sembler long et tortueux.

Je remercie l'équipage de l'Invincible pour m'avoir soutenue et choyée surtout durant les derniers mois : mille mercis à JB, Cyrille, Julie, Jean-Sauveur et Kapopic.

Je remercie tous les membres de l'association Kir pour cette belle aventure : grand merci surtout à Sheb, Delphine, Thomas et Elise pour le moral que ce soit les jours de blues ou les jours de fêtes.

Je remercie l'équipe de Radio-Campus Dijon pour les bouffées d'air musicales et en particulier Antoine pour les premiers pas « sur scène » et à l'antenne.

Je remercie tous mes amis d'ici et d'ailleurs (Anne-Morwenn, Guigui, Jojo) pour m'avoir soutenue pendant cette thèse (promis maintenant je viendrai vous voir plus souvent).

Et merci à Mallory pour les corrections, le soutien mais surtout pour le reste.

Merci à tous.....Ne changez rien.



## Résumé

L'atrazine, un des herbicides les plus utilisés pour contrôler le développement des plantes adventices dans les cultures, a conduit à la contamination de l'environnement. L'exposition chronique à cet herbicide a conduit à l'émergence de populations microbiennes du sol capables de dégrader l'atrazine et de l'utiliser comme une source d'azote pour leur croissance. Ces populations microbiennes sont responsables de la biodégradation accélérée (BDA) de l'atrazine, un service écosystémique contribuant à diminuer la persistance de cet herbicide dans l'environnement. L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes génétiques et physiologiques responsables du fonctionnement et de l'amélioration de ce service écosystémique. Nous avons appliqué une démarche expérimentale allant des gènes codant la dégradation à des communautés microbiennes afin d'identifier les processus adaptatifs impliqués dans l'évolution de la fonction de BDA de l'atrazine.

Le premier volet a consisté à évaluer l'importance de mutations accumulées dans le gène *atzA* dans la transformation de l'atrazine en hydroxyatrazine catalysée par AtzA. Le séquençage de gènes *atzA* de différents isolats bactériens dégradant l'atrazine (*Pseudomonas* sp. ADP WT, *Pseudomonas* sp. ADP Ps et différents *Chelatobacter heintzii*) a montré que la séquence du gène *atzA* était très conservée. Toutefois quatre mutations non silencieuses ont pu être identifiées (1 chez *Pseudomonas* sp. ADP MSE et 3 chez *Chelatobacter heintzii*). La modélisation de la structure de la protéine AtzA a permis de montrer que trois des mutations étaient situées dans des régions importantes (site actif, poche de liaison avec l'atrazine et liaison avec le métal Fe<sup>2+</sup>). Afin de caractériser l'importance de ces mutations, l'activité de dégradation des différentes isoformes d'AtzA et de protéines obtenues par une approche de mutagenèse dirigée a été mesurée. Ces études montrent que la mutation observée chez *Pseudomonas* sp. ADP Ps diminue l'activité de dégradation d'AtzA par rapport à celle de *Pseudomonas* sp. ADP WT tandis que les mutations observées chez *C. heintzii* diminuent l'activité de dégradation de l'atrazine mais favorise celle de dégradation de la simazine. La fixation de ces mutations pourrait être expliquée (i) par le relâchement de la pression de sélection exercée sur *atzA* pour la population *Pseudomonas* sp. ADP Ps et (ii) par la sélection de populations capables d'accéder à deux s-triazines, respectivement.

Le second volet a consisté à étudier la plasticité de la voie de biodégradation de l'atrazine dans deux conditions opposées : (i) la première visait à évaluer la persistance de la capacité de dégradation en absence de pression de sélection et (ii) la seconde visait à évaluer l'évolution de la capacité de dégradation en présence d'une pression de sélection élevée. Pour conduire ces études, des manipulations d'évolution expérimentale sur *Pseudomonas* sp. ADP ont été menées. (i) L'exposition à l'acide cyanurique, intermédiaire métabolique de l'atrazine, a conduit à la sélection d'une population nouvellement évoluée capable de croître plus rapidement dans un milieu de culture ne contenant que l'acide cyanurique comme source d'azote. Cette population est caractérisée par une délétion d'une région de 47 kb du plasmide ADP1 contenant les gènes *atzABC*. Les analyses conduites ont permis de conclure que le gain de compétitivité de la population évoluée résidait dans la perte du fardeau génétique représenté par la région de 47 kb, la capacité de dégradation de l'acide cyanurique restant inchangée. (ii) L'exposition à l'atrazine a conduit à la sélection d'une population nouvellement évoluée caractérisée par l'insertion du plasmide ADP1 en quasi-totalité sur le chromosome bactérien. Cet événement génétique ne contribue à améliorer ni la croissance ni la dégradation de l'atrazine. Le gain de compétitivité de la souche évoluée pourrait résider dans la stabilité de la transmission verticale de la fonction de biodégradation. Ces deux expériences montrent que la plasticité des génomes microbiens contribue à l'adaptabilité de la fonction de biodégradation de l'atrazine.

Le troisième volet a consisté à développer un outil permettant d'évaluer, à l'échelle d'une communauté microbienne synthétique, l'évolution du potentiel génétique dégradant. Pour ce faire quatre souches dégradantes dont une, *Arthrobacter* sp. TES6, isolée au cours de cette étude, ont été choisies. Présentant des fonds génétiques et potentiels dégradants différents, elles ont été manipulées afin de leur conférer des résistances à des antibiotiques permettant de les sélectionner. Une expérience d'évolution a été initiée afin de valider l'outil. Les premières analyses montrent qu'il est fonctionnel et, qu'à terme, il devrait permettre d'étudier l'évolution du potentiel génétique dégradant d'un consortium placé dans différentes conditions environnementales.

Ces travaux montrent que la fonction de biodégradation accélérée de l'atrazine est très versatile et qu'elle est en constante évolution. Il met en évidence que le principal facteur pilotant cette évolution est le niveau d'exposition des populations dégradantes au pesticide.

**Mots clefs :** biodégradation, atrazine, évolution expérimentale, gène *atz*, séquences d'insertion



## Summary

Atrazine, one of the most used herbicide to control the development of weeds in crop, has led to the contamination of the environment. Repeated exposure to this herbicide resulted in the emergence of microbial populations able to degrade atrazine and to use it as a nitrogen source for its growth. These microbial populations are responsible for accelerated biodegradation of atrazine (BDA), a key ecosystemic service diminishing the persistence of this herbicide in the environment. The aim of this PhD work was to study genetic and physiological mechanisms responsible for functioning and improving of this ecosystemic service. We applied an experimental approach starting from genes to communities degrading atrazine in order to identify processes of adaptation involved in the evolution of accelerated biodegradation function.

The first part of the PhD aimed at evaluating the importance of accumulation of single mutations in the *atzA* gene for the activity of AtzA transforming atrazine to hydroxyatrazine. Sequencing of *atzA* genes amplified from different atrazine-degrading isolates (*Pseudomonas* sp. ADP WT, *Pseudomonas* sp. ADP Ps and different *Chelatobacter heintzii*) showed that *atzA* sequence was conserved. However, four non synonymous mutations were identified (1 for *Pseudomonas* sp. ADP Ps and 3 for *Chelatobacter heintzii*). Modeling of AtzA structure showed that three mutations were located in important regions (active site, interaction with atrazine and with the metal  $Fe^{2+}$ ). In order to characterize the importance of these mutations, degrading activity of the different AtzA isoforms and of proteins obtained by directed mutagenesis was estimated. Results showed that mutation of *Pseudomonas* sp. ADP Ps diminished the atrazine degrading activity as compared to that of *Pseudomonas* sp. ADP WT while the mutations of *C. heintzii* diminished atrazine-degrading activity but favored simazine degradation. Fixation of these mutations might be explained by (i) the relaxation of the selection pressure exerted on *atzA* for the *Pseudomonas* sp. ADP Ps and (ii) the selection of microbial populations able to degrade two kinds of *s*-triazines, respectively.

The second part aimed at studying the plasticity of the atrazine-degrading pathway in two opposed conditions: (i) one aiming at evaluating the persistence of degrading capability in absence of selection pressure and (ii) a second one aiming at evaluating the evolution of degrading capability under high selection pressure exerted by atrazine. With these aims, experimental evolutions were carried out with *Pseudomonas* sp. ADP. (i) We showed that cyanuric acid exposure led to the selection of a newly-evolved population characterized by increased growing ability on culture medium containing this substance as nitrogen source. This population is characterized by the deletion of a 47 kb region containing *atzABC* genes from ADP1. We showed that increased fitness of newly-evolved population was due to the selective loss of the genetic burden represented by the 47 kb region, the cyanuric acid degrading ability remaining unchanged. (ii) Atrazine exposure led to the selection of population characterized by the insertion of ADP1 plasmid in the bacterial chromosome. This genetic event did not contribute to neither promote growth nor atrazine-degrading abilities. The gain of fitness of the newly-evolved population might result from the stability of the vertical transmission of the biodegrading function. These two studies showed that the plasticity of microbial genomes contributes to the adaptability of the atrazine-biodegrading function.

The third part aimed at developing a tool allowing monitoring the evolution of atrazine-degrading genetic potential at the scale of a synthetic microbial community. To do so four degrading strains among which, one was isolated in this study, were chosen. Showing different genetic backgrounds and degrading genetic potentials, they were manipulated to select antibiotic resistant isolates. An evolution experiment was initiated to validate the tool. Preliminary results showed that it seems functional and that in fine it may allow studying the evolution of atrazine-degrading potential within a bacterial consortium submitted to different environmental conditions.

Altogether, these results showed that the atrazine accelerated biodegradation function is highly versatile and under constant evolution. Furthermore, they highlight that the exposure to atrazine is the key parameter driving the evolution of degrading population

**Key words :** biodegradation, atrazine, experimental evolution, *atz* gene, insertion sequence



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
ARN : Acide RiboNucléique  
CAS : Chemical Abstracts Service  
Coll : Collaborateur  
CSP : Précurseur du peptide déclencheur de la compétence  
DDE : Ce dit d'enzyme présentant un domaine conservé Asp (D), Asp (D) et Glu (E)  
dNTP : Desoxy-Nucléotide-Tri-Phosphate  
DO<sub>600nm</sub> : Densité Optique à 600 nanomètres  
dpm : désintégration par minutes  
EC : Enzyme Commission number  
EDTA : Ethyle-Diamine-Tétra-Acétate (acide éthylène diamine tétracétique)  
EPA : Environment Protection Agency  
FOC : Fraction de Carbone Organique  
Gt : Gigatonnes  
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
HPLC: High Pressure Liquid Chromatography  
HRAC : Herbicides Resistance Action Committee  
IR : Sequence Inversées Répétées  
IS : Séquence d'Insertion  
IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
IUPP : Union des Industries de la Protection des Plantes  
Kb : Kilo (paire de) bases  
LB : Luria Bertani  
mbq : milliBecquerel  
ORF : Open reading frame (Cadre de lecture ouvert)  
pb : Paire de base  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
ppm : Partie par millions  
Rpm : rotation par minute  
SIP : Stable Isotope Probing  
Tris : trishydroxyméthylaminométhane  
UA : Unité Arbitraire  
UE : Union Européenne  
UV : Ultra-Violet  
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside



# TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : LE SOL ET LA BIODEGRADATION.....	4
<b>1. LE SOL .....</b>	<b>4</b>
1.1 BASES DE PEDOLOGIE.....	4
1.1.1 <i>Origine du sol</i> .....	4
1.1.2 <i>Pédogenèse</i> .....	4
a) Formation des sols.....	5
b) Les différentes fractions du sol.....	5
1.1.3 <i>Caractéristiques physiques du sol</i> .....	7
1.1.4 <i>Caractéristiques chimiques du sol</i> .....	7
1.1.5 <i>Etat et rôle de l'eau dans le sol</i> .....	7
1.2 LES FONCTIONS DU SOL .....	8
1.2.1 <i>Influence sur la qualité de l'atmosphère</i> .....	8
1.2.2 <i>Lieu de vie et réservoir de diversité génétique</i> .....	8
1.2.3 <i>Rôle épurateur</i> .....	8
1.3 POLLUTIONS DU SOL .....	9
<b>2. LES PESTICIDES .....</b>	<b>10</b>
2.1 LES HERBICIDES.....	11
a) Devenir des pesticides dans le sol : le phénomène d'adsorption .....	12
b) Evaluation du potentiel d'adsorption des herbicides .....	13
2.2 L'ATRAZINE .....	14
2.2.1 <i>Caractéristiques moléculaires et physico-chimiques de l'atrazine</i> .....	14
a) Nomenclature et structure chimique.....	14
b) Propriétés physico-chimiques.....	14
c) L'atrazine : un inhibiteur de la photosynthèse .....	15
d) Utilisation et législation .....	16
e) Aspects toxicologiques.....	16
2.2.2 <i>Devenir de l'atrazine dans l'environnement</i> .....	17
a) Dynamique de l'atrazine dans les sols.....	17
b) Les facteurs environnementaux influençant la dynamique de l'atrazine dans le sol.....	18
<b>3. LES BACTERIES DANS LE SOL .....</b>	<b>18</b>
3.1 BIODIVERSITE MICROBIENNE DU SOL.....	18
3.1.1 <i>Phylogénique</i> .....	18
3.1.2 <i>Fonctionnelle</i> .....	19
3.2 LA BIODEGRADATION BACTERIENNE DES PESTICIDES.....	20
3.3 LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE DANS L'ENVIRONNEMENT.....	21



3.3.1	<i>Dégradation abiotique</i> .....	21
3.3.2	<i>Dégradation biotique</i> .....	21
a)	Voie co-métabolique.....	21
b)	La minéralisation : dégradation complète de l'atrazine.....	22
3.4	ORGANISATION DES GENES DE DEGRADATION DE L'ATRAZINE .....	24
3.4.1	<i>Variation de la composition génétique du potentiel dégradant</i> .....	24
3.4.2	<i>Localisation des gènes</i> .....	25
<b>CHAPITRE II : LES ENZYMES DE LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE; ASPECTS</b>		
<b>BIOCHIMIQUES.....</b>		
<b>27</b>		
<b>1. LES AMIDO-HYDROLASES (EC 3) .....</b>		
<b>27</b>		
<b>2. LES 6 ENZYMES DE LA VOIE ATZ DE DEGRADATION BACTERIENNE DE L'ATRAZINE.....</b>		
<b>28</b>		
2.1	ATZA (ATRAZINE CHLOROHYDROLASE) (EC 3.1.1.8).....	28
2.2	TRZN (ATRAZINE CHLOROHYDROLASE) (EC 3.1.1.8).....	31
2.3	L'HYDROXYATRAZINE N-ETHYLAMINOHYDROLASE (ATzB) [EC 3.5.99.3].....	34
2.4	N-ISOPROPYL-AMMELIDE N-ISOPROPYLAMINOHYDROLASE (ATzC) [EC 3.5.99.4].....	35
2.5	L'OPERON ATZ D, E ET F .....	36
2.5.1	<i>AtzD (EC 3.5.2.15)</i> .....	36
2.5.2	<i>AtzE (EC 3.5.1.84)</i> .....	37
2.5.3	<i>AtzF (EC 3.5.1.54)</i> .....	37
2.6	BIOENERGETIQUE ET THERMODYNAMIQUE DE LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE .....	37
<b>CHAPITRE III : LES MECANISMES GENETIQUES A L'ORIGINE DE L'ACQUISITION DES</b>		
<b>POTENTIALITES DE DEGRADATION CHEZ LES BACTERIES.....</b>		
<b>39</b>		
<b>3. LES TRANSFERTS HORIZONTALS.....</b>		
<b>39</b>		
3.1	LE PHENOMENE DE CONJUGAISON BACTERIENNE .....	40
3.1.1	<i>Mécanisme</i> .....	40
3.1.2	<i>Intérêt évolutif</i> .....	41
3.2	LA TRANSDUCTION .....	42
3.2.1	<i>Les bactériophages</i> .....	42
a)	Cycle lysogénique.....	42
b)	Cycle lytique .....	43
3.2.2	<i>La transduction comme moteur de l'évolution bactérienne</i> .....	43
3.3	LA TRANSFORMATION NATURELLE .....	43
3.3.1	<i>Acquisition de l'état de compétence</i> .....	44
3.3.2	<i>Production et excrétion du facteur de compétence</i> .....	44
3.3.3	<i>Mécanisme général de la transformation</i> .....	45
a)	Entrée de la molécule d'ADN.....	45
b)	Déroulement et internalisation du fragment .....	46
<b>4. LES MODIFICATIONS INTERNES DU GENOME BACTERIEN.....</b>		
<b>49</b>		



4.1 LA MUTATION.....	49
4.1.1 Les différents types de mutations .....	49
a) La substitution.....	49
b) Insertion et délétion (mutations concernant plusieurs bases).....	49
4.1.2 Les causes de mutations .....	50
a) Les mutations spontanées.....	50
b) Mutations induites .....	51
4.2 LA TRANSPOSITION .....	52
4.2.1 Nature et mécanisme.....	53
a) Structure des transposons .....	53
b) Nomenclature des transposons .....	53
c) Mécanisme de la transposition.....	54
4.3 DELETIONS DE GENES.....	58
<b>OBJECTIFS ET HYPOTHESES.....</b>	<b>59</b>
➤ AXE 1 : DIVERSITE GENETIQUE DU GENE ATZÁ AU SEIN DE POPULATIONS MICROBIENNES DEGRADANT L'ATRAZINE : IMPACT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES CHLOROHYDROLASES ET CONSEQUENCE SUR L'EVOLUTION DES POPULATIONS DEGRADANT L'ATRAZINE. ....	60
➤ AXE 2 : APPROCHE D'ECOLOGIE EVOLUTIVE IN VITRO : EVOLUTION DU POTENTIEL GENETIQUE DE POPULATION MICROBIENNE DEGRADANTE SOUMISE A LA PRESSION DE SELECTION DE L'ATRAZINE ET DE L'ACIDE CYANURIQUE. ....	61
➤ AXE 3 : APPROCHE COMMUNAUTAIRE : CONSTRUCTION D'UN OUTIL POUR EVALUER L'EVOLUTION DU POTENTIEL GENETIQUE D'UNE COMMUNAUTE MICROBIENNE DEGRADANT L'ATRAZINE. ....	62
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>64</b>
<b>1. SOUCHES.....</b>	<b>64</b>
<b>2. MILIEUX DE CULTURE .....</b>	<b>64</b>
<b>3. EXPERIENCE D'ECOLOGIE EVOLUTIVE IN VITRO .....</b>	<b>64</b>
<b>4. CINETIQUE DE CROISSANCE .....</b>	<b>65</b>
4.1 EN MILIEU TY .....	65
4.2 EN MILIEU MSA OU MSAC.....	65
<b>5. CINETIQUE DE DEGRADATION ET DE MINERALISATION.....</b>	<b>66</b>
5.1 PRODUCTION DE BIOMASSE .....	66
5.2 ANALYSE DE LA CAPACITE DE DEGRADATION DES POPULATIONS BACTERIENNES .....	66
5.2.1 Atrazine .....	66
5.2.2 Acide cyanurique .....	66
5.3 ANALYSE DE DEGRADATION : HPLC.....	67
5.4 CINETIQUE DE MINERALISATION .....	67
<b>6. METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES.....</b>	<b>68</b>



6.1 PRE-TRAITEMENT PCR.....	68
6.2 EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE DE HAUTE QUALITE.....	68
6.3 EXTRACTION DE L'ADN PLASMIDIQUE .....	68
<b>7. AMPLIFICATIONS GENETIQUES .....</b>	<b>68</b>
7.1 POLYMERISATION EN CHAINE (PCR).....	68
7.1.1 Amplification .....	68
7.1.2 Electrophorèse.....	69
7.1.3 Révélation.....	70
7.2 PCR-RFLP (PCR-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) .....	70
7.3 LONGUE PCR .....	70
<b>8. PROFILS PLASMIDIQUES .....</b>	<b>71</b>
8.1 PLASMIDE ECKHARDT .....	71
8.2 ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE .....	72
8.2.1 Préparation des inserts et lyse bactérienne.....	73
8.2.2 Traitement des inserts .....	73
8.2.3 Electrophorèse.....	74
<b>9. CLONAGE ET SEQUENÇAGE DES AMPLICONS.....</b>	<b>74</b>
9.1 PURIFICATION.....	74
9.2 LIGATION .....	74
9.3 CRIBLAGE DES CLONES RECOMBINANTS.....	75
9.4 SEQUENÇAGE .....	76
<b>10. SOUTHERN BLOT .....</b>	<b>76</b>
10.1 DIGESTION .....	76
10.2 TRANSFERT DE L'ADN DIGERE SUR MEMBRANE DE NYLON.....	76
10.3 PREPARATION DES SONDAS.....	77
10.4 HYBRIDATION.....	77
10.5 DESHYBRIDATION .....	79
<b>11. SUREXPRESSION PROTEIQUE.....</b>	<b>79</b>
11.1 PRINCIPE .....	79
11.2 CONSTRUCTION DES VECTEURS DE SUREXPRESSION.....	80
11.3 MUTAGENÈSE DIRIGÉE .....	80
11.4 PURIFICATION PROTEIQUE .....	81
<b>12. ANALYSE BIOINFORMATIQUE .....</b>	<b>81</b>
<b>13. MODELISATION ET ANALYSE STATISTIQUE.....</b>	<b>82</b>
13.1 MODELISATION DE LA CROISSANCE .....	82
13.2 MODELISATION DE LA MINERALISATION .....	82



13.3 ANALYSES STATISTIQUES .....	82
<b>RESULTATS.....</b>	<b>83</b>
<b>AXE 1 : DIVERSITE GENETIQUE DU GENE ATZA AU SEIN DE POPULATIONS</b>	
<b>MICROBIENNES DEGRADANT L'ATRAZINE : IMPACT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES</b>	
<b>CHLOROHYDROLASES ET CONSEQUENCE SUR L'EVOLUTION DES POPULATIONS</b>	
<b>DEGRADANT L'ATRAZINE.....</b>	<b>83</b>
<b>PREAMBULE.....</b>	<b>83</b>
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>83</b>
<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>84</b>
<b>2. INTRODUCTION.....</b>	<b>84</b>
<b>3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>86</b>
3.1 STRAINS .....	86
3.2 <i>ATZA</i> SEQUENCES .....	87
3.3 BACTERIAL CULTURE.....	87
3.4 CONSTRUCTION OF EXPRESSION VECTORS.....	87
3.5 SITE-DIRECTED MUTAGENESIS.....	88
3.6 PROTEIN PURIFICATION .....	88
3.7 ENZYME ASSAYS.....	89
3.8 ESTIMATION OF THE AFFINITY OF Fe <sup>2+</sup> BINDING.....	89
3.9 ESTIMATION OF THERMAL STABILITY.....	90
<b>4. RESULTS.....</b>	<b>90</b>
4.1 CHARACTERISATION OF THE ATRAZINE-DEGRADING ISOLATES.....	90
4.2 LOCATION OF THE NATURALLY OCCURRING SUBSTITUTIONS IN ATZA.....	91
4.3 KINETIC PROPERTIES OF THE NATURALLY OCCURRING ATZA VARIANTS.....	91
4.4 PHYSICAL PROPERTIES OF ATZAPS AND ATZACH.....	92
<b>5. DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
5.1 EFFECTS OF THE SUBSTITUTIONS.....	92
5.2 EVOLUTIONARY CONSIDERATIONS.....	94
<b>6. CONCLUSION .....</b>	<b>95</b>
<b>AXE 2 : APPROCHE D'ECOLOGIE EVOLUTIVE <i>IN VITRO</i> : EVOLUTION DU POTENTIEL</b>	
<b>GENETIQUE DE POPULATION MICROBIENNE DEGRADANTE SOUMISE A LA PRESSION DE</b>	
<b>SELECTION DE L'ATRAZINE ET DE L'ACIDE CYANURIQUE.....</b>	
<b>PREAMBULE.....</b>	<b>97</b>
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>98</b>
A) EXPANSION-REDUCTION DE LA VOIE DE DEGRADATION DE L'ATRAZINE CHEZ <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP.....	98



B) AMELIORATION DE LA COMPETITIVITE DE LA POPULATION DEGRADANTE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP .....	98
<b>ARTICLE : PUBLIÉ DANS GENE : <i>IN VITRO</i> EVOLUTION OF AN ATRAZINE-DEGRADING POPULATION UNDER CYANURIC ACID SELECTION PRESSUR : EVIDENCE FOR THE SELECTIVE LOSS OF A 47 KB REGION ON THE PLASMID PADP1 CONTAINING THE <i>ATZA, B</i> AND <i>C</i> GENES.</b> .....	<b>99</b>
<b>1. ABSTRACT</b> .....	<b>100</b>
<b>2. INTRODUCTION</b> .....	<b>101</b>
<b>3. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>103</b>
3.1 STRAIN AND MEDIA.....	103
3.2 <i>IN VITRO</i> EVOLUTION EXPERIMENT .....	103
3.3 GROWTH KINETICS.....	103
3.4 CYANURIC ACID DEGRADATION ABILITY OF CRUDE CELL EXTRACTS .....	104
3.5 PLASMID PROFILE .....	104
3.6 ANALYSIS OF THE ATRAZINE-DEGRADING GENETIC POTENTIAL BY PCR.....	105
3.7 SOUTHERN BLOT ANALYSIS .....	105
3.8 LONG PCR .....	106
<b>4. RESULTS</b> .....	<b>106</b>
4.1 EVOLUTION OF GROWTH AND OF CYANURIC ACID DEGRADING CAPABILITIES OF <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP .	106
4.2 EVIDENCE FOR DNA REARRANGEMENT .....	107
<b>5. DISCUSSION</b> .....	<b>109</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>112</b>
<b>B) AMELIORATION DE LA COMPETITIVITE DE LA POPULATION DEGRADANTE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP</b> .....	<b>112</b>
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>112</b>
<b>DISPOSITIF EXPERIMENTAL</b> .....	<b>113</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>113</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>116</b>
<b>AXE 3 : APPROCHE COMMUNAUTAIRE : CONSTRUCTION D'UN OUTIL POUR EVALUER L'EVOLUTION DU POTENTIEL GENETIQUE D'UNE COMMUNAUTE MICROBIENNE DEGRADANT L'ATRAZINE</b> .....	<b>119</b>
<b>PREAMBULE</b> .....	<b>119</b>
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>120</b>
<b>DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE</b> .....	<b>121</b>



<b>ISOLEMENT DE LA SOUCHE <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES 6 D'UN SOL AGRICOLE DU DELTA DU NIL (EGYPTE).....</b>	<b>121</b>
<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>122</b>
<b>2. INTRODUCTION.....</b>	<b>123</b>
<b>3. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>125</b>
3.1. CHEMICALS .....	125
3.2. MEDIUM.....	125
3.3. SOIL SAMPLES.....	125
3.4. ATRAZINE MINERALIZATION POTENTIAL OF SOIL .....	126
3.5. ISOLATION OF ATRAZINE-DEGRADING STRAINS.....	126
3.6. CLONING AND SEQUENCING OF 16S rDNA SEQUENCE.....	126
3.7. PCR ASSAYS OF ATRAZINE-DEGRADING GENES .....	127
3.8. DETERMINATION OF THE ATRAZINE-DEGRADING CAPACITY OF <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6 .....	127
3.9. PLASMID PROFILES.....	128
3.10. MODELLING OF ATRAZINE MINERALIZATION KINETICS.....	128
<b>4. RESULTS.....</b>	<b>128</b>
4.1. ATRAZINE MINERALIZATION POTENTIAL OF THE AGRICULTURAL SOIL .....	128
4.2. ISOLATION OF AN ATRAZINE-DEGRADING BACTERIAL STRAIN .....	129
4.3. CHARACTERIZATION OF THE ATRAZINE-DEGRADING ABILITY OF <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6 AND ITS ATRAZINE-DEGRADING GENETIC POTENTIAL .....	130
<b>5. DISCUSSION.....</b>	<b>130</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>133</b>
<b>FABRICATION D'UN <i>CONSORTIUM</i> "MODELE" DEGRADANT .....</b>	<b>133</b>
<b>1. DESCRIPTION DES SOUCHES DEGRADANTES CHOISIES DANS LE SOUCHIER.....</b>	<b>133</b>
<b>2. SELECTION DE SOUCHES RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>134</b>
<b>3. MISE EN PLACE DE L'EXPERIENCE DE L'EVOLUTION EXPERIMENTALE.....</b>	<b>135</b>
3.1 MODE DE CULTURE DU <i>CONSORTIUM</i> .....	135
3.2 SUIVI DE LA DENSITE POPULATIONNELLE DU <i>CONSORTIUM</i> .....	135
3.3 SUIVI DE LA COMPOSITION DU POTENTIEL GENETIQUE DEGRADANT DE CHAQUE POPULATION.....	136
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>136</b>
4.1 MISE EN PLACE DE L'EXPERIENCE EVOLUTIVE .....	136
4.2 EVOLUTION DE LA COMPOSITION SPECIFIQUE DU <i>CONSORTIUM</i> .....	137
4.3 EVOLUTION DU POTENTIEL GENETIQUE DEGRADANT DE CHAQUE POPULATION CONSTITUANT LE <i>CONSORTIUM</i> DEGRADANT.....	138
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>143</b>



<i>AXE 1 : DIVERSITE GENETIQUE DU GENE ATZA AU SEIN DE POPULATIONS MICROBIENNES DEGRADANT L'ATRAZINE : IMPACT SUR L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES CHLOROHYDROLASES ET CONSEQUENCE SUR L'EVOLUTION DES POPULATIONS DEGRADANT L'ATRAZINE.....</i>	<b>144</b>
<i>AXE 2 : APPROCHE D'ECOLOGIE EVOLUTIVE IN VITRO: EVOLUTION DU POTENTIEL GENETIQUE DE POPULATION MICROBIENNE DEGRADANTE SOUMISE A LA PRESSION DE SELECTION DE L'ATRAZINE ET DE L'ACIDE CYANURIQUE.</i>	<b>147</b>
<i>AXE 3 : APPROCHE COMMUNAUTAIRE : CONSTRUCTION D'UN OUTIL POUR EVALUER L'EVOLUTION DU POTENTIEL GENETIQUE D'UNE COMMUNAUTE MICROBIENNE DEGRADANT L'ATRAZINE.....</i>	<b>151</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>153</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>154</b>



# LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE A-1 : LES DIFFERENTS HORIZONS DU SOL.....	4
FIGURE A-2 : REPARTITION DU CARBONE EN FONCTION DES BIOMES (D'APRES LE RAPPORT DU GIEC). ....	5
FIGURE A-3 : LES CLASSES GRANULOMETRIQUES D'APRES L'AFNOR 1998 (CALVET, 2003).....	6
FIGURE A-4 : TRIANGLE DES TEXTURES D'APRES LE SERVICE DE CARTOGRAPHIE DES SOLS DE FRANCE (JAMAGNE ET AL., 1995).....	6
FIGURE A-5 : MACRO ET MICROFLORE DU SOL REPARTIES SELON LEUR TAILLE (BEARE ET AL., 1995). ....	8
FIGURE A-6 : PRINCIPAUX PROCESSUS CONTROLANT LE CYCLE DES CONTAMINANTS (BONNET, 2000). ....	8
FIGURE A-7 : LE CYCLE DE L'EAU. ....	9
FIGURE A-8 : MARCHE MONDIAL (EN MILLIONS D'EUROS) DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES EN 2006 (D'APRES L'UIPP RAPPORT ANNUEL 2007). ....	10
FIGURE A-9 : A) EVOLUTION DU MARCHE DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES (EN MILLIONS D'EUROS) EN EUROPE DEPUIS 2005 ; B) MARCHE MONDIAL EN 2006 (D'APRES L'UIPP, RAPPORT ANNUEL 2007). ....	10
FIGURE A-10 : CLASSIFICATION DES HERBICIDES SELON LEUR MODE D'ACTION (HARC).....	11
FIGURE A-11 : PROCESSUS IMPLIQUES DANS LE DEVENIR DES PESTICIDES DANS LES SOLS ET CONDITIONNANT LEUR DISPONIBILITE ET PAR CONSEQUENT LEUR EFFICACITE D'UN POINT DE VUE PHYTOSANITAIRE AINSI QUE LEUR CARACTERE POLLUANT (BARRIUSO ET AL., 1997).....	12
FIGURE A-12: STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ATRAZINE.....	14
FIGURE A-13 : LISTE DES PRINCIPAUX PESTICIDES ET METABOLITES DETECTES DANS LES EAUX DE SURFACE (ENQUETE IFEN N°9, DECEMBRE 2007, DONNEES 2005).....	14
FIGURE A-14 : LES FORMES ISOMERIQUES DES TRIAZINES.....	14
FIGURE A-15 : REPARTITION DE L'ATRAZINE DANS LES DIFFERENTS COMPARTIMENTS DE LA BIOSPHERE (TISSIER ET AL., 2005). ....	15
FIGURE A-16 : INHIBITION DU PHOTOSYSTEME II PAR LA MOLECULE D'ATRAZINE. LE FLUX D'ELECTRONS EST BLOQUE LORSQUE L'ATRAZINE OCCUPE LE DOMAINE DE FIXATION DE LA PROTEINE QB.....	15
FIGURE A-17 : CONTRIBUTION DES ARNr 16S DES DIFFERENTS MEMBRES DE DIFFERENTS <i>PHYLA</i> DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE DU SOL (JANSSEN, 2006).....	18
FIGURE A-18 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES GRANDS GROUPES BACTERIENS.....	19
FIGURE A-19 : VOIE DE DEGRADATION DU CATECHOL ABOUTISSANT A LA FORMATION DE <i>B</i> CETO-ADIPATES DONT L'ETAPE SUIVANTE EST LA FORMATION D'ACETYL-CO <sub>A</sub> ET DE SUCCINATE (PELMONT, 2005). ....	20
FIGURE A-20 : VOIES DE DEGRADATION BIOTIQUE ET ABIOTIQUE DES PESTICIDES.....	21
FIGURE A-21 : LES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA DEGRADATION CO-METABOLIQUE DE L'ATRAZINE : DEA (DESETHYLATRAZINE), DIA (DEISOPROPYLATRAZINE), DEIA (DESETHYLDEISOPROPYLATRAZINE)...	22
FIGURE A-22 : VOIE METABOLIQUE DE LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE ; A : VOIE HAUTE ; B : VOIE BASSE. ....	22
FIGURE A-23 : REGULATION DE LA VOIE BASSE ( <i>ATZDEF</i> ) PAR <i>ATZR</i> (GARCIA-GONZALEZ ET AL., 2005). ....	23
FIGURE A-24 : LIEUX D'ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES DEGRADANT L'ATRAZINE A TRAVERS LE MONDE. .....	24
FIGURE A-25 : CARTE DU PLASMIDE PADP1 DE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP. ....	25
FIGURE A-26 : STRUCTURE DE LA LYSINE 5,6-AMINOMUTASE PRESENTANT UN TONNEAU TIM (BERKOVITCH ET AL., 2004). ....	27
FIGURE A-27 : REPARTITION DES AMIDOHYDROLASES ENTRE LES DIFFERENTS <i>PHYLA</i> BACTERIENS (PROTEIN DATA BANK : <a href="http://www.pdb.org">HTTP://WWW.PDB.ORG</a> ). ....	28
FIGURE A-28 : PREMIERE ETAPE DE LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE CATALYSEE PAR <i>ATZA</i> .....	28
FIGURE A-29 : DEFINITIONS ENZYMOLOGIQUES. ....	32
FIGURE A-30 : STRUCTURE DE L'ENZYME <i>TRZN</i> (SEFFERNICK ET AL., 2010). ....	32
FIGURE A-31 : SECONDE ETAPE DE LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE CATALYSEE PAR <i>ATZB</i> (BOUNDY-MILLS ET AL., 1997). ....	33
FIGURE A-32 : GROUPES ALKYLES DES TRIAZINES ASYMETRIQUES (ENCADRES SUR LES MOLECULES) PREFERENTIELLEMENT HYDROLYSES PAR <i>ATZB</i> (SEFFERNICK ET AL., 2007).....	34
FIGURE A-33 : REACTION CATALYSEE PAR <i>ATZC</i> (SADOWSKY ET AL., 1998).....	34
FIGURE A-34: POURCENTAGE D'IDENTITE D' <i>ATZC</i> AVEC D'AUTRES ENZYMES APPARTENANT A LA FAMILLE DES AMIDOHYDROLASES (A) ET D'AUTRES PROTEINES DEGRADANT L'ATRAZINE (B) (SADOWSKY ET AL., 1998).....	35
FIGURE A-35 : REACTION CATALYSEE PAR <i>ATZE</i> CONDUISANT A LA TRANSFORMATION DU BIURET EN ALLOPHANATE (SHAPIR ET AL., 2002).....	36
FIGURE A-36 : DISTRIBUTION SELON LEUR ORIGINE DES DIFFERENTES SEQUENCES CODANTES RETROUVEES AU SEIN DE DIFFERENTS ORGANISMES (OCHMAN ET AL., 2000).....	38
FIGURE A-37 : MECANISME GENERAL DECRIVANT LA CONJUGAISON BACTERIENNE (GRIFFITHS ET AL., 2000). ....	39



FIGURE A-38 : SCHEMA REPRESENTANT LE TRANSFERT DE L'ADN DE LA CELLULE DONNEUSE A LA CELLULE RECEVEUSE LORS DE LA CONJUGAISON BACTERIENNE (LLOSA <i>ET AL.</i> , 2002).....	40
FIGURE A-39 : STRUCTURE D'UN BACTERIOPHAGE. ....	41
FIGURE A-40 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE LYSOGENIQUE D'UN BACTERIOPHAGE (SCHAECHTER <i>ET AL.</i> , 1999). ....	41
FIGURE A-41 : DESCRIPTION SCHEMATIQUE DE L'INSERTION DE L'ADN PHAGIQUE DANS L'ADN DE LA CELLULE HOTE (D'APRES THORPE AND SMITH, 1998).....	41
FIGURE A-42 : SCHEMA REPRESENTANT LE CYCLE LYTIQUE D'UN BACTERIOPHAGE (DOCUMENTS EN LIGNE, INSTITUT PIERRE ET MARIE CURIE).....	42
FIGURE A-43 : SCHEMA DU MECANISME EXTERNE DE LA TRANSFORMATION CHEZ LES BACTERIES A GRAM-NEGATIF (DUBNAU, 1999). ....	44
FIGURE A-44 : L'ENTREE DE LA MOLECULE D'ADN CHEZ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> . (CHEN <i>ET AL.</i> , 2005). ....	44
FIGURE A-45 : ISOMERES CETO OU ENOL , AMINO OU IMINO DES ACIDES NUCLEIQUES.....	49
FIGURE A-46 : DIMERES DE PYRIMIDINES GENERES PAR L'EXPOSITION AUX RAYONS ULTRA-VIOLET (UV) (GIGLIAMARI AND SARASIN, 2003). ....	50
FIGURE A-47 : EXEMPLES D'ELEMENTS TRANSPOSABLES APPARTENANT A DIFFERENTES CLASSES (GALAS <i>ET AL.</i> , 1989).....	52
FIGURE A-48 : SCHEMA D'UN ELEMENT TRANSPOSABLE. ....	52
FIGURE A-49 : LES DEUX TYPES DE TRANSPOSITION (HALLET AND SHERRATT, 1997).....	53
A : LA TRANSPOSITION NON REPLICATIVE (COUPER-COLLER) .....	53
B : LA TRANSPOSITION REPLICATIVE (COPIER-COLLER) .....	53
FIGURE A-50: LES TROIS MODES DE TRANSPOSITION CONSERVATIVE. ....	54
A) LES DEUX EXTREMITES SONT ROMPUES : FORMATION DE LA STRUCTURE EN EPINGLE.....	54
B) LES DEUX EXTREMITES SONT ROMPUES : FORMATION DE LA STRUCTURE DE SHAPIRO. ....	54
C) UNE SEULE EXTREMITÉ EST ROMPUE : FORMATION D'UN INTERMEDIAIRE CIRCULAIRE. ....	54
FIGURE A-51 : LA TRANSPOSITION REPLICATIVE (SERRE, 2005). ....	55
FIGURE A-52 : CARTE DU PLASMIDE PADP1 DE <i>PSEUDOMONAS SP.</i> ADP REPRESENTANT LES GENES DEGRADATION ET LES ELEMENTS D'INSERTION (IS) ET <i>PDHL</i> LIKE. ....	56
FIGURE B-1 : HALO DE DEGRADATION RESULTANT DE LA SOLUBILISATION DE L'ATRAZINE LIE A L'ACTIVITE DEGRADANTE MICROBIENNE DANS UN MILIEU GELOSE.....	63
FIGURE B-2 : CHAÎNE HPLC VARIAN (INRA DIJON).....	66
FIGURE B-3 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ATRAZINE. ....	66
FIGURE B-4 : CARTE DES VECTEURS DE CLONAGE PCR @2.1 TOPO ET pGEM-T EASY (INVITROGEN®, PROMEGA®).....	73
FIGURE B-5 : SCHEMA DU MATERIEL DE TRANSFERT DES ACIDES NUCLEIQUES D'UN GEL D'AGAROSE SUR UNE MEMBRANE DE NYLON POUR HYBRIDATION EN SOUTHERN BLOT.....	75
FIGURE B-6 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-TETRADECAHYDROCYCLOPENTA[A]PHENANTHREN-17-YL]-2H-FURAN-5-ONE (DIGOXYGENINE, ROCHE®). ....	76
FIGURE B-7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INDUCTION PAR L'IPTG DE LA PRODUCTION PROTEIQUE BACTERIENNE <i>IN VIVO</i> . ....	78
FIGURE B-8 : SCHEMA DU VECTEUR D'EXPRESSION PCS150.....	79
FIGURE C-1: SUBSTRATES USED IN THE ENZYME ASSAYS DESCRIBED IN THE TEXT. ....	88
FIGURE C-2: ALIGNMENT OF THE NUCLEOTIDE SEQUENCES OF ATZAWT, ATZACH AND ATZAPS. ....	89
FIGURE C-3: ALIGNMENT OF THE INFERRED PROTEIN SEQUENCES FOR ATZAWT, ATZACH AND ATZAPS.....	89
FIGURE C-4: ACTIVE SITE AMINO ACID RESIDUES IN THE ATZA HOMOLGY MODEL WITH BOUND ATRAZINE AND Fe <sup>2+</sup> (SCOTT <i>ET AL.</i> , 2009).. ....	90
FIGURE C-5 : THE SPECIFICITY (KCAT/KM) OF ATZAWT, ATZACH AND ATZAPS AGAINST ATRAZINE, SIMAZINE, TRIETAZINE AND PROPAZINE. ....	90
FIGURE C-6: SPECIFICITY (KCAT/KM) OF ATZAWT, ATZACH, AND MUTANT ATZAWT ENZYMES AGAINST ATRAZINE AND SIMAZINE. ....	90
FIGURE C-7 : PERCENT ACTIVITY (WITH 100 μM SIMAZINE) REMAINING AFTER INCUBATING ATZAWT, ATZACH AND ATZAPS FOR 10 MIN AT TEMPERATURES RANGING FROM 30 °C – 70 °C.....	91
FIGURE C-8 : RELATIVE ACTIVITIES OF APOENZYMES OF ATZAWT, ATZACH AND THE VARIANTS BEARING THE INDIVIDUAL AMINO ACID DIFFERENCES BETWEEN THEM AFTER TITRATION BY Fe <sup>2+</sup> . ....	91
FIG. D-1 : PANEL A : GROWTH CURVES OF ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) <i>PSEUDOMONAS SP.</i> ADP POPULATIONS GROWN IN CYANURIC ACID MINERAL SALT MEDIUM (MSCA).....	103
PANEL B : CYANURIC ACID DEGRADATION KINETICS OF ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) POPULATIONS OF <i>PSEUDOMONAS SP.</i> ADP MEASURED IN CYANURIC ACID AND MINERAL SALT MEDIUM (MSCA) GROWTH CONDITIONS. ....	103



FIG. D-2 .PANEL A : CYANURIC ACID DEGRADATION KINETICS OF ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) POPULATIONS OF <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP ESTIMATED FROM CRUDE CELL EXTRACTS PREPARED FROM ATRAZINE MINERAL SALT MEDIUM (MSA) OR CYANURIC ACID MINERAL SALT MEDIUM MSCA, RESPECTIVELY, INCUBATED IN KNAPP BUFFER. ....	104
PANEL B : GROWTH CURVES OF ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP POPULATIONS CULTIVATED IN A RICH MEDIUM.....	104
FIG. D-3 :PANELS A AND B : SOUTHERN BLOT HYBRIDIZATION OF THE GENOMIC DNA OF ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) POPULATIONS OF <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP. ....	105
PANEL C : PLASMID PROFILES OF ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) POPULATIONS OF <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP.. ....	105
FIG. D-4 :-PANELS A : IN SILICO MAPS OF PADP1 FROM ORIGINAL (ADPO) AND NEWLY EVOLVED (ADPE) POPULATIONS. <i>SMAI</i> (S) AND <i>NruI</i> (N) RESTRICTION SITES ARE SHOWN AS WELL AS RESTRICTION FRAGMENTS HYBRIDIZED BY ATZF AND ISPPsI PROBES. ....	106
PANEL B : GENOMIC ORGANIZATION OF THE PADP1 REGION IN THE ORIGINAL <i>PSEUDOMONAS</i> SP. POPULATION (ADPO) DELIMITED BY <i>TRAC</i> AND <i>TRBN</i> GENES (79 918BP) AND FOCUS ON THE TWO REGIONS INVOLVED IN THE DELETION BY HOMOLOGOUS RECOMBINATION. ....	106
FIGURE D-5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODE OPERATOIRE MIS EN PLACE POUR L' EXPERIENCE D'EVOLUTION MENEESUR <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP T-34 ET ANALYSES ASSOCIEES. ....	109
FIGURE D-6 : ANALYSE PAR SOUTHERN BLOT DES SOUCHES T34 ET T100. ....	110
FIGURE D-7 :A) PROFIL PLASMIDIQUE DES SOUCHES ADPO, T34 ET T100 PAR PLASMIDE ECKHARDT. ....	110
B) PROFIL D'HYBRIDATION DU PLASMIDE ECKHARDT D'ADP, T34 ET T100.....	110
FIGURE D-8 : SEPARATION DU PLASMIDE ET DU CHROMOSOME DES POPULATIONS ADP T34 ET T100 PAR S1-PFGE(A) ET HYBRIDATION EN SOUTHERN BLOT AVEC LA SONDE <i>ATZB</i> (B) ....	111
FIGURE D-9 : L'ADN DES POPULATIONS T34 ET T100 A ETE DIGERE PAR L'ENZYME <i>SpeI</i> AFIN DE GENERER UN PROFIL DE RESTRICTION PAR PFGE (A). LE PROFIL A ETE HYBRIDE AVEC UNE SONDE CIBLANT LE PLASMIDE ADP1 DANS SON INTEGRALITE (B).....	111
FIGURE D-10 : CAPACITE DE MINERALISATION DE L' ATRAZINE PAR LES POPULATIONS DE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADP T34 ET T100.....	113
FIGURE E-1: COOPERATION METABOLIQUE AU SEIN D'UN <i>CONSORTIUM</i> DEGRADANT (SMITH <i>ET AL.</i> , 2006).....	116
FIGURE E-2 : LES DIFFERENTS TYPES DE PRESSIONS EXERCEES ....	117
FIGURE E-3 : KINETICS OF MINERALIZATION OF <sup>14</sup> C RING-LABELLED ATRAZINE MEASURED IN SOIL SAMPLES COLLECTED FROM AN AGRICULTURAL FIELD LOCATED IN AL-GHARBIA GOVERNORATE (NILE DELTA, EGYPT) AND TREATED EITHER ONCE (Δ) OR TWICE (□) WITH ATRAZINE.....	124
FIGURE E-4 : NEIGHBOUR-JOINING PHYLOGENETIC ANALYSIS RESULTING FROM MULTIPLE ALIGNMENT OF THE 16S rRNA GENE OF <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6 AND RELATED SEQUENCES FOUND IN THE GENBANK DATABASE. ATRAZINE-DEGRADING ISOLATES ARE IN BOLD. ....	125
FIGURE E-5 : KINETICS OF ATRAZINE DEGRADATION BY <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6 INOCULATED IN KNAPP BUFFER CONTAINING 50 MG L <sup>-1</sup> ATRAZINE. ....	125
FIGURE E-6 : KINETICS OF <sup>14</sup> C-CHAIN-LABELLED ATRAZINE MINERALIZATION BY <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6 INCUBATED IN THE DARK AT 28°C UNDER 150 RPM AGITATION. ERROR BARS INDICATE STANDARD ERRORS (N = 3). ....	126
FIGURE E-7 :PANEL A. PLASMID PROFILES OF <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6. ....	126
PANELS B, C AND D; SOUTHERN BLOT HYBRIDIZATION CARRIED OUT ON PLASMID PROFILES OF <i>ARTHROBACTER</i> SP. TES6.....	126
FIGURE E-8 : PROTOCOLE DE LA MANIPULATION D'EVOLUTION EXPERIMENTALE CONDUITE SUR LE <i>CONSORTIUM</i> DEGRADANT SYNTHETIQUE CONSTITUE DE <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ADPE, <i>ARTHROBACTER TES</i> , <i>C. HEINTZII</i> SR38 ET <i>VARIOVORAX</i> SP. 38R ET DES ANALYSES EFFECTUEES POUR CHACUN DES MEMBRES DU <i>CONSORTIUM</i> . ....	131
FIGURE E-9 : ABONDANCE DES 4 POPULATIONS AU SEIN DU <i>CONSORTIUM</i> AU COURS DES CYCLES DE CULTURE...	133
FIGURE E-10 : COMPOSITION DU POTENTIEL GENETIQUE DEGRADANT DES DIFFERENTES POPULATIONS AU COURS DE L'EVOLUTION EXPERIMENTALE.. ....	134



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU A-I : UTILISATION DES PESTICIDES EN FONCTION DES CULTURES (D'APRES L'UIPP). .....	10
TABLEAU A-II : VALEURS DES KOC OBSERVES POUR DIFFERENTS PESTICIDES (JURY <i>ET AL.</i> , 1987). .....	13
TABLEAU A-III : IDENTITE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES <i>ATZA</i> , <i>ATZB</i> , <i>ATZC</i> OU <i>TRZN</i> ENTRE DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES DEGRADANT L'ATRAZINE. LE POURCENTAGE D'IDENTITE DES GENES <i>ATZ</i> EST EXPRIME PAR RAPPORT A <i>PSEUDOMONAS SP. ADP</i> ET CELUI DU GENE <i>TRZN</i> PAR RAPPORT A <i>NOCARDIOIDES SP. C190</i> . .....	24
TABLEAU A-IV : COMPOSITION EN ACIDES AMINES D'ATZA (DE SOUZA <i>ET AL.</i> , 1996). .....	29
TABLEAU A-V : POURCENTAGE D'IDENTITE DES GENES DE LA VOIE HAUTE DE DIFFERENTES SOUCHES DEGRADANT L'ATRAZINE PAR RAPPORT A CEUX DE <i>PSEUDOMONAS SP. ADP</i> (DE SOUZA <i>ET AL.</i> , 1998). .....	35
TABLEAU B-I : LISTE DES SOUCHES BACTERIENNES EMPLOYEES DANS CETTE ETUDE : [ATR <sup>+</sup> ] DEGRADE L'ATRAZINE ; [AC <sup>+</sup> ] DEGRADE L'ACIDE CYANURIQUE; [SPN <sup>R</sup> ] RESISTANTE A LA SPECTINOMYCINE; [KAN <sup>R</sup> ] RESISTANCE A LA KANAMYCINE; [STP <sup>R</sup> ] RESISTANTE A LA STREPTOMYCINE; [TRC <sup>+</sup> ] RESISTANTE A LA TETRACYCLINE. ....	63
TAB. C-I : PCR PRIMERS USED FOR AMPLIFYING 16S rRNA AND <i>ATZA</i> SEQUENCES AND TO CONSTRUCT <i>ATZA</i> VARIANTS. ALL PRIMERS WERE SYNTHESIZED BY GENEWORKS (HINDMARSH, AUSTRALIA). .....	85
TABLE D-I : PRIMERS USED TO PERFORM PCR REACTIONS. ....	102
TABLE D-II : GROWTH PARAMETERS OF THE ANCESTOR (ADPO) AND THE NEWLY EVOLVED POPULATIONS (ADPE) OF <i>PSEUDOMONAS SP. ADP</i> IN MSCA AND TY MEDIA. ....	103
TABLEAU D-III : LISTE DES AMORCES UTILISEES DANS CETTE ETUDE. ....	110
TABLEAU D-IV : PARAMETRES DE CROISSANCE DES POPULATIONS T34 ET T100. ....	113
TAB. E-I : SEQUENCE OF THE PRIMER PAIRS USED IN THIS STUDY. ....	123
TABLEAU E-II : SOUCHES EMPLOYEES DANS CETTE ETUDE. LES GENES DE DEGRADATION <i>ATZ/TRZ</i> PRESENTS CHEZ CHAQUE SOUCHE AINSI QUE LES ANTIBIOTIQUES AUXQUELS ELLES RESISTENT SONT INDIGUES. ....	129



## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE I : Composition des milieux de culture

ANNEXE II : Les amorces utilisées lors de cette thèse

ANNEXE III : 5th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and the 11th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Marseille (France), October, 22nd-25th 2008.

ANNEXE IV : 6th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and the 12th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Matera (Italy), September, 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2010.

ANNEXE V : ARTICLE PUBLIES



# **INTRODUCTION GENERALE**



## INTRODUCTION

Le phénomène d'adaptation bactérienne aux modifications environnementales est la matérialisation de l'immense plasticité génétique dont elles disposent. C'est d'ailleurs précisément ce paramètre qui a autorisé leur omniprésence d'un point de vue géographique (puisqu'elles sont capables de coloniser les milieux extrêmes) et biogéochimique (car indispensables à la réalisation des cycles naturels). Leur adaptation à la biodégradation des molécules d'origine anthropique constitue une autre prouesse évolutive à l'échelle temporelle, étant donné la fréquence à laquelle les activités humaines ont généré de nouveaux intrants.

L'histoire de l'agriculture débute il y a 10000 ans et ce sont 10000 ans de progrès techniques dont la révolution industrielle a initié l'accélération et qui a été à l'origine d'une forte évolution en termes de rendement mais aussi en termes de dégradation des sols. Outre la désertification anthropique inhérente à l'agriculture et dont les prémices remontent à l'âge de bronze, on considère l'utilisation des produits phytosanitaires responsable dans certains cas d'altérations du sol et de son microcosme.

Utilisés depuis l'époque romaine, les herbicides culminent actuellement par leur variété en corrélation avec le nombre de cibles incriminées. L'utilisation massive des herbicides est actuellement controversée en raison d'effets avérés ou présumés sur l'environnement et sur la santé publique. On considère les familles d'herbicides en fonction de leur structure chimique et de leur mode d'action : les herbicides inhibiteurs de la synthèse d'acides aminés, les herbicides auxiniques, les herbicides inhibiteurs des pigments (herbicides décolorants), les herbicides inhibiteurs de la photosynthèse.

Parmi cette dernière catégorie, l'atrazine a représenté jusqu'à 50% des ventes mondiales et a constitué une des molécules les plus utilisées dans la lutte contre les plantes adventices et ce, notamment dans les plantations de maïs, de sorgho ou de canne à sucre. Le succès de cette molécule est lié à son faible coût de production, son efficacité et sa facilité d'application ; ces paramètres expliquant son ubiquité géographique même au niveau des zones polaires.

Bien que cette molécule n'ait pas été classifiée parmi les substances toxiques, son utilisation est actuellement prohibée en Europe. Cette interdiction a été la conséquence d'observations de plus en plus fréquentes de sa présence dans les milieux aquatiques. La controverse liée à son éventuelle toxicité fait toujours polémique puisque ce ne sont pas moins de 26 publications ou présentations scientifiques réalisées au cours des dernières années qui rapportent les effets



toxiques de cette molécule. C'est au niveau des premiers horizons édaphiques que l'atrazine va être en contact avec la flore du sol. Cette dernière regroupe un nombre très important de macro et microorganismes dont les activités confèrent au sol son rôle de réacteur biogéochimique. Si l'utilisation de ces herbicides est susceptible d'altérer l'équilibre physico-chimique d'un sol, la composante biologique subira également des modifications qualitatives et quantitatives.

En effet, la présence de xénobiotiques va modifier la structuration populationnelle des microorganismes, bactéries et champignons. Néanmoins, en corrélation avec leur stratégie nutritionnelle ou énergétique, ils pourront en retour influencer sur la concentration, le transfert et la transformation des molécules chimiques du sol. Les bactéries, en raison d'une capacité de multiplication élevée et d'une forte plasticité génétique, ont pu développer des résistances ou des stratégies nutritionnelles leur permettant de pallier ou d'utiliser la présence d'herbicides dans le sol.

Ainsi, l'utilisation de l'atrazine a entraîné l'émergence de populations bactériennes adaptées dont la multiplication est à l'origine d'une diminution de la quantité d'atrazine dans le sol. Ce phénomène est à la base du concept de BioDégradation Accélérée (BDA). De plus, les cellules bactériennes sont susceptibles d'échanger des fragments d'ADN, échanges qui seront à l'origine du partage de la fonction de biodégradation.

Ainsi, certains types bactériens sont capables d'utiliser l'atrazine comme source d'azote, ce qui leur permet de coloniser des niches écologiques vacantes des sols pollués. Cette faculté repose sur la présence de gènes dont le produit protéique interagira avec la molécule d'atrazine et ses métabolites à des fins énergétiques. De plus ces gènes sont localisés sur des parties génomiques mobiles qui vont pouvoir être transmis à d'autres types de souches.

Chez notre souche modèle, *Pseudomonas sp.* ADP, les enzymes impliquées dans la voie de dégradation de l'atrazine sont au nombre de 6. Les trois premières étapes de la dégradation de l'atrazine consistent en 3 hydrolyses catalysées successivement par l'atrazine chlorohydrolase (AtzA), l'hydroxyatrazine éthylaminohydrolase (AtzB) et la N-isopropyl-ammélide N-isopropylaminohydrolase (AtzC).

La voie haute (upper pathway) aboutit à la transformation de l'atrazine en acide cyanurique. Cet intermédiaire catabolique est par la suite transformé en dioxyde de carbone et en ammonium *via* l'action de trois autres enzymes constituant la voie basse (lower pathway). D'un point de vue génétique, AtzA, AtzB et AtzC sont codées par trois gènes localisés, chez *Pseudomonas ADP*, sur le



plasmide catabolique pADP1 d'environ 100 Kb. La présence de séquences d'insertion (IS1071 et IS*Pps1*) flanquant les gènes *atzA* et *atzB* suggère leur implication dans la construction de ce plasmide *via* des recombinaisons homologues.

Les enzymes AtzD, AtzE et AtzF (lower pathway) sont codées par trois gènes (respectivement *atzD*, *atzE* et *atzF*) organisés sous forme d'un « cluster » soumis à la régulation transcriptionnelle d'un régulon, placé sous la régulation du gène *atzR* codant pour un facteur de transcription de type *lysR* (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005)

L'objectif de cette thèse, dans la continuité de celle réalisée par Marion Devers-Lamrani, a été d'étudier l'adaptation des bactéries à la présence d'atrazine et ce à différentes échelles (protéique, populationnelle, communautaire).

La première échelle d'investigation est celle de la protéine de dégradation en elle-même, contextualisée au niveau écologique. Nous avons souhaité comprendre si des mutations ponctuelles au niveau des acides nucléiques pouvaient être à l'origine d'une amélioration des performances de l'enzyme et tenter d'expliquer le phénomène d'un point de vue écologique.

La seconde échelle est celle de la population c'est-à-dire la réponse génétique qu'adoptent les souches face à la présence d'atrazine ou d'intermédiaires cataboliques. Aussi, nous avons souhaité comprendre les modifications génétiques, se produisant chez certains individus de la population, dont l'intérêt évolutif a été à l'origine de la fixation de cette modification dans l'ensemble de la population.

La troisième échelle est celle de la communauté bactérienne : il a en effet été montré que l'application répétée d'herbicide (par exemple : atrazine, isoproturon, 2,4-D) exerçait une pression de sélection sur les populations microbiennes du sol qui conduisait à leur adaptation (c'est-à-dire à l'acquisition du potentiel génétique codant des enzymes cataboliques spécifiques) (Barriuso *et al.* 1996, El Sebai *et al.* 2005, Vallaeys *et al.* 1996), suggérant que le climax de la fonction de la biodégradation accélérée est atteint lorsqu'une population microbienne acquiert l'ensemble du potentiel génétique dégradant. Aussi, nous avons souhaité mettre au point une communauté bactérienne artificielle et sélectionnable afin d'évaluer l'*optimum* de la fonction de biodégradation, soumise à différentes pressions de sélection.



# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

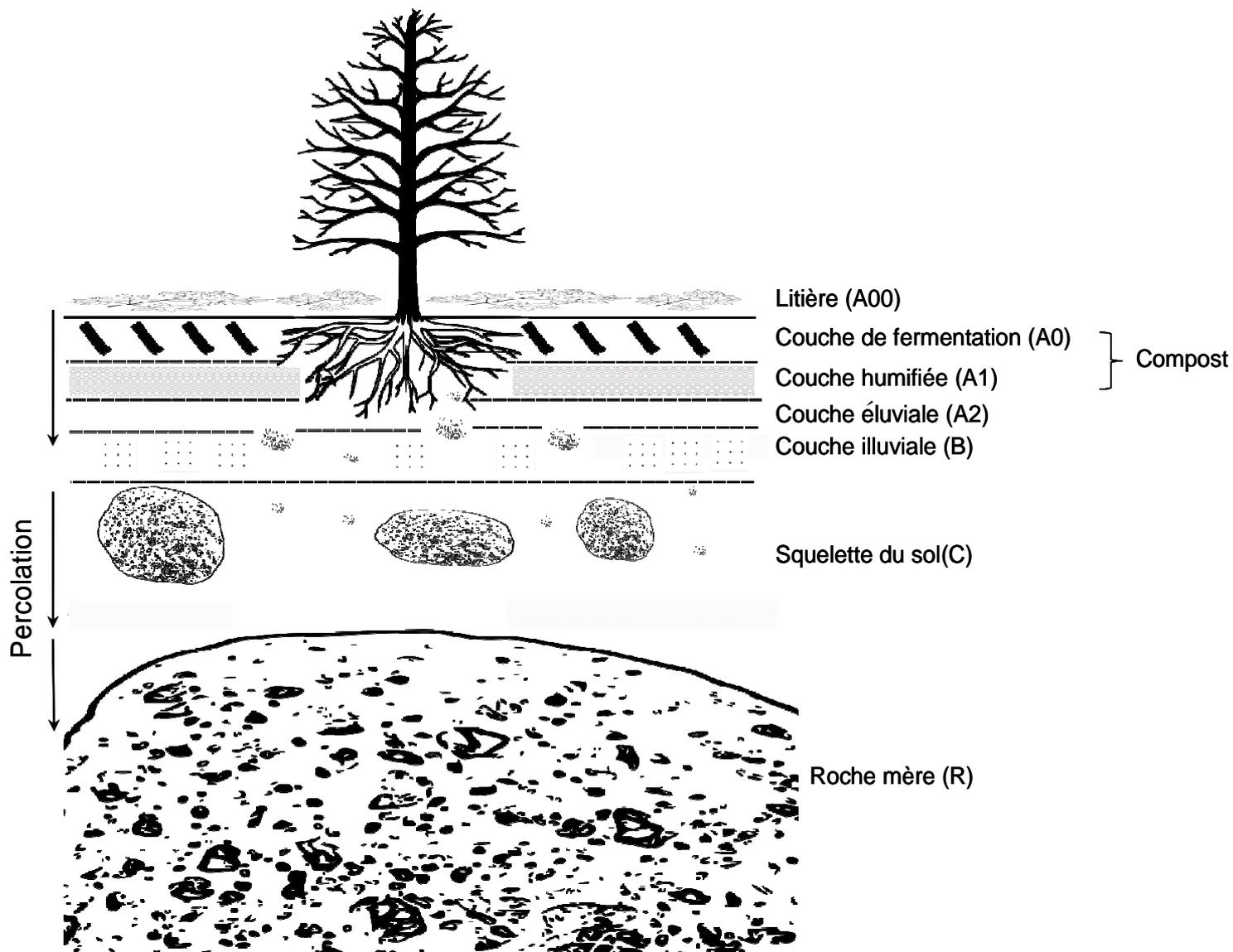


Figure A-1 : les différents horizons du sol.

# CHAPITRE I : LE SOL ET LA BIODEGRADATION

## 1. Le Sol

*« Le sol est un milieu naturel, différencié en horizons, à constituants minéraux et (ou) organiques, généralement meubles, d'épaisseur variable, qui diffère de la roche-mère sous-jacente par certains caractères morphologiques, ses propriétés physiques, sa composition, ses propriétés chimiques, et par ses caractères biologiques » (Joffe, 1936).*

### 1.1 Bases de pédologie

#### 1.1.1 Origine du sol

Le sol constitue une interface entre les compartiments atmosphérique, lithosphérique et biosphérique. Il est la résultante du mélange progressif de ces trois domaines. Les processus fondamentaux intervenant dans la pédogenèse sont la transformation de la roche mère et l'apport de matière organique provenant majoritairement de la biosphère. La transformation de la roche mère est fonction de la température et de l'origine de la roche et peut s'opérer différemment en fonction des conditions environnementales. La désagrégation, c'est-à-dire le fractionnement progressif de la roche mère, est un phénomène lié à des forces physiques résultant du ruissellement, à des variations brutales de température (gel/dégel) ainsi qu'à l'action du système racinaire végétal. L'altération chimique de la roche est également fonction de la teneur en dioxygène et dioxyde de carbone présents dans l'air et dans les espaces interstitiels. Elle dépend aussi de la concentration en acides organiques, susceptibles d'altérer les roches calcaires. Les apports de matières organiques sont essentiellement d'origine végétale et peuvent être directement incorporés dans le sol (décomposition racinaire) ou s'accumuler à la surface de ce dernier (accumulations végétales). Les débris végétaux sont alors décomposés par la faune du sol (lombrics, arthropodes, acariens...) puis transformés en matières organiques plus ou moins complexes par des microorganismes (bactéries et champignons). Eventuellement, la matière organique peut, par la suite être, minéralisée en éléments solides et gazeux (dioxyde de carbone, nitrates, sulfates et phosphates) ou humifiée, aboutissant alors à l'élaboration de molécules complexes.

#### 1.1.2 Pédogenèse

*« Ensemble de processus pédologiques élémentaires amenant à la formation d'un sol à partir d'un matériau parental » (Baize, 2004).*

##### a) Formation des sols

La composition et les caractéristiques physico-chimiques de la roche mère vont avoir un rôle prépondérant dans la pédogenèse aboutissant à la stratification du sol en horizons (Figure A-1).

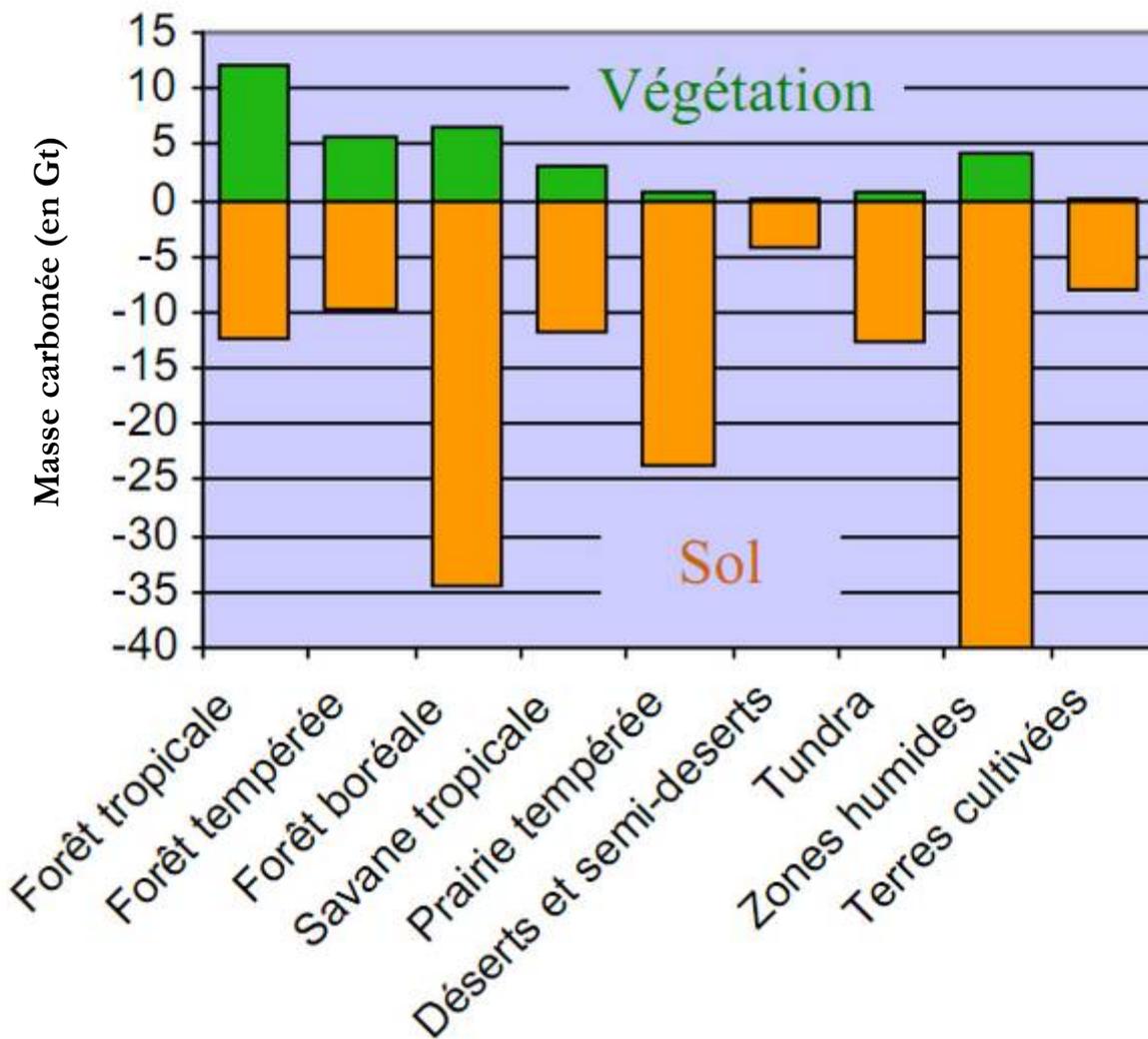


Figure A-2 : répartition du carbone en fonction des biomes (d'après le rapport du GIEC).

De plus, la topographie (pente, exposition) constitue un paramètre influençant la rapidité d'érosion de la roche. La composition du couvert végétal constitue également un facteur majeur influençant la pédogenèse. Ainsi, les espèces végétales riches en azote, telles que les légumineuses (fixant l'azote atmosphérique), ou celles produisant des cires et résines, affecteront la nature du sol notamment la teneur en  $\text{NO}_3^-$  ainsi que le pH. Les facteurs climatologiques sont également des moteurs de la pédogenèse puisqu'ils agissent à la fois sur la roche mère et sur la nature du couvert végétal. Cet impact climatologique est visible à l'échelle du globe et ce, quelles que soient les ères géologiques considérées, puisqu'il concourt à définir la zonation des sols. On pourra ainsi définir cinq catégories de sols : i) non évolués (ii) tchernozem (iii) à profils évolués (iv) métalliques et (v) hydromorphes, dont la formation est la résultante des différents facteurs énoncés précédemment.

#### b) Les différentes fractions du sol

Le sol se distribue en 4 fractions : (i) minérale (ii) organique (iii) liquide et (iv) gazeuse. Ces quatre fractions sont en permanente interaction par le biais d'échanges.

- *La fraction minérale* : elle est constituée de particules présentant un gradient granulométrique. La fraction la plus fine, liée à sa concentration en oxydes, argiles, hydroxydes et minéraux, est souvent considérée comme étant la plus réactive (Stengel and Gelin, 1998). Ce phénomène est lié, d'une part, au fait qu'au *pro rata* du nombre de particules, celles-ci présentent une surface d'échange importante et, d'autre part, à leurs propriétés physico-chimiques (telles que l'électronégativité des argiles). Elle représente 93 à 95% du poids total du sol. Elle est composée d'éléments de tailles très diverses provenant de la fragmentation plus ou moins avancée de la roche mère, de particules colloïdales dont la charge peut être variable, et d'ions minéraux libres (Davet, 1996).

- *La fraction organique* : elle est constituée d'une forme brute (déchets végétaux en décomposition) et d'une forme humifiée (acides fulviques et humiques). Les acides fulviques correspondent à la fraction de la matière organique alkylée (Ogner and Schnitzer, 1970). Les sols, selon leur origine, présentent des teneurs en matières organiques différentes (balayant un large spectre de concentrations) en lien avec les facteurs climatologiques (Figure A-2). Ainsi, on distingue les histosols qui contiennent 30% du carbone total des sols, les cambisols, les acrisols, les chernozems et les kastanozems 18%, les podzols 12,5% et les ferrasols 9,5% (Calvet, 2003). Les sols présentent des taux de matière organique différents, s'échelonnant selon un gradient croissant depuis les sols désertiques en *quasi* totalité minéraux, jusqu'aux sols des tourbières presque totalement organiques. Les sols cultivés présentent, quant à eux, un pourcentage de

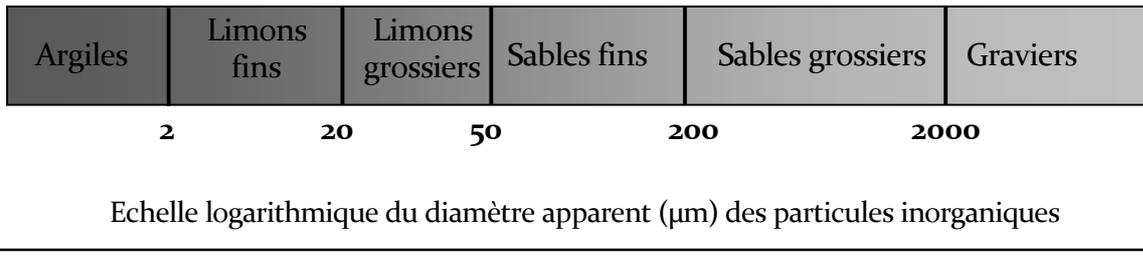


Figure A-3 : les classes granulométriques d'après l'AFNOR 1998 (Calvet, 2003).

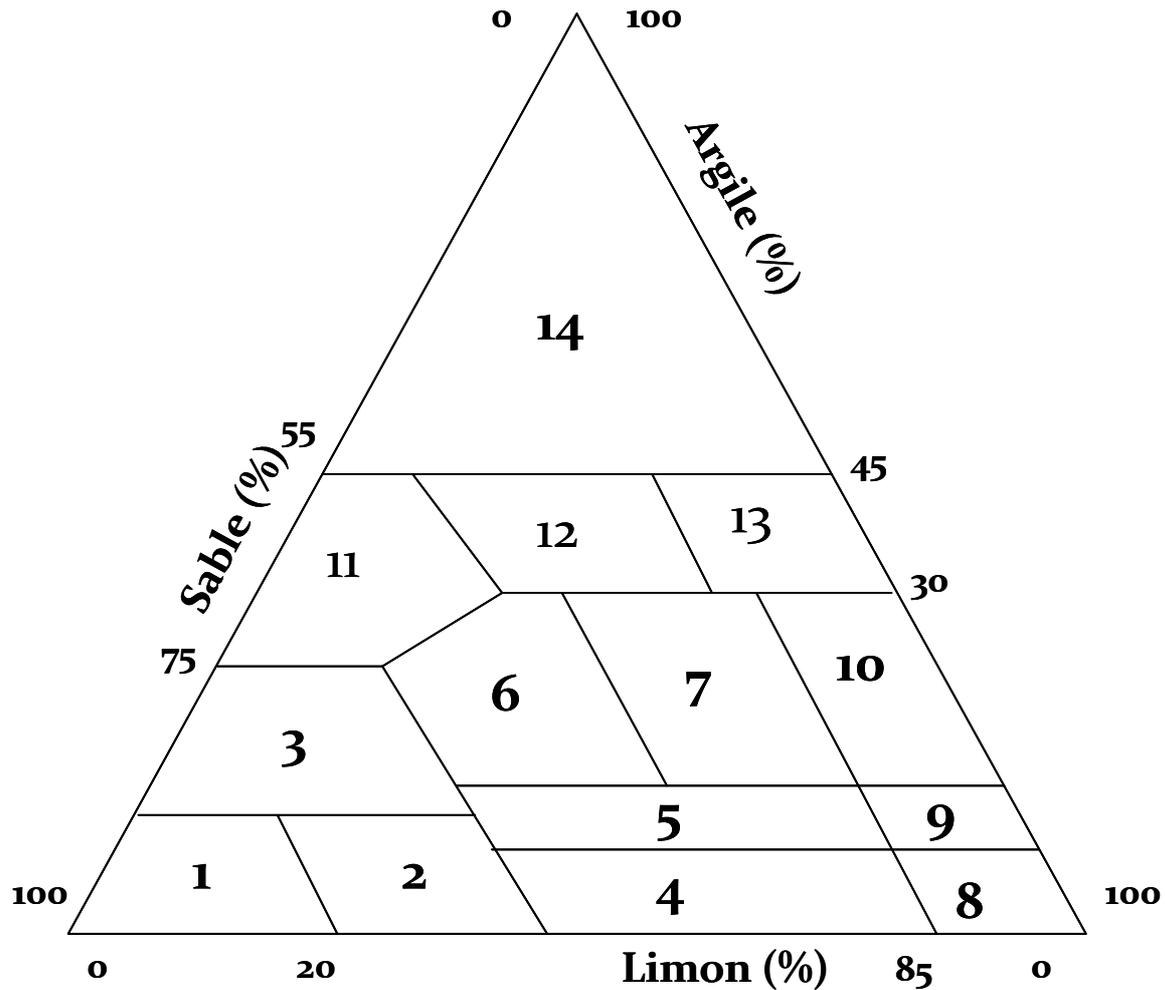


Figure A-4 : triangle des textures d'après le Service de Cartographie des Sols de France (Jamagne *et al.*, 1995). Classes texturales : 1 : sable ; 2 : sable limoneux ; 3 : sable argileux ; 4 : limon léger sableux ; 5 : limon moyen sableux ; 6 : limon sablo-argileux ; 7 : limon argilo-sableux ; 8 : limon léger ; 9 : limon moyen ; 10 : limon argileux ; 11 : argile sableuse ; 12 : argile ; 13 : argile limoneuse ; 14 : argile lourde.

matière organique compris entre 0 et 20% avec une valeur médiane inférieure à 10% (Calvet, 2003). La tendance semble indiquer que les pratiques agricoles dites « intensives », ayant recours de façon *quasi* systématique aux intrants chimiques (engrais et pesticides), conduisent à l'appauvrissement des sols arables en matières organiques. Cette problématique d'origine agronomique pourrait s'avérer à terme être une problématique environnementale majeure, notamment dans le contexte du réchauffement global lié à l'émission de gaz à effet de serre résultant de la consommation importante en énergies fossiles. Les sols agricoles sont ainsi souvent considérés comme un réservoir de carbone substantiel susceptible de stocker du carbone et donc de lutter contre l'effet de serre.

#### - *La fraction liquide et gazeuse*

Liquide : la phase liquide du sol, souvent appelée solution du sol, présente une composition complexe. Elle est enrichie de substances organiques et inorganiques dissoutes dont la nature et la concentration sont la résultante de paramètres extrinsèques. L'étude de la solution du sol est rendue complexe par sa grande variabilité spatiale et temporelle (Mader, 1963). Elle est en effet tributaire des phénomènes de désorption, dissolution, précipitation et adsorption. Néanmoins, on peut cependant distinguer deux catégories de solutés (Sposito, 2008) :

- les micro-éléments dont la concentration n'excède pas  $1 \text{ mmol m}^{-3}$ . De nombreux éléments traces métalliques d'origine naturelle ou anthropique (Jeng and Bergseth, 1992) appartiennent à cette catégorie ;

- les macro-éléments dont la concentration est supérieure à  $1 \text{ mmol m}^{-3}$  :  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Si}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{O}_2^-$  sont classés dans cette catégorie.

Gazeuse : la phase gazeuse du sol possède généralement une composition proche de l'air même si de plus en plus d'études montrent que sa composition varie spatio-temporellement en fonction de paramètres tels que la profondeur et l'activité biologique des animaux et des microorganismes. Ainsi, la composition de l'air du sol sera d'autant plus différente de celle de l'air atmosphérique que l'on s'éloignera de la surface (Soutter and Musy, 1991). Elle dépendra également de la porosité et de l'humidité du sol qui conditionnera l'état oxydatif du sol (oxique *versus* anoxique). De plus, l'activité biologique des végétaux et des microorganismes (notamment la respiration) induit des variations de la composition de la phase gazeuse qui sont des paramètres proximaux connus pour réguler l'activité microbienne tellurique.

### 1.1.3 Caractéristiques physiques du sol

Elles se définissent selon deux critères qui sont la texture et la structure (Figure A-3 et A-4).



La première fait référence à la composition granulométrique du sol, et est définie par les proportions relatives de particules de dimensions différentes. La seconde fait référence à la qualité et au mode d'assemblage des particules solides composant le sol. On distingue 3 principales structures :

- *Les sols en agrégats* : riches en cations, ils aboutissent à une floculation des particules par neutralisation des ions;
- *Les sols massifs* : relatifs à l'état dispersé des colloïdes;
- *Les sols à structure particulaire* : l'absence totale des argiles y interdit toute cohésion, les rendant particulièrement filtrants.

#### 1.1.4 Caractéristiques chimiques du sol

Elles peuvent être déclinées selon deux principales propriétés : le pouvoir absorbant en ions minéraux et la valeur du pH. Ainsi, la formation d'un complexe argilo-humique absorbant sera à l'origine d'une fixation cationique ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).

#### 1.1.5 Etat et rôle de l'eau dans le sol

Les molécules d'eau dans le sol sont soumises à deux forces physiques antagonistes : la gravité et la capillarité. A celles-ci s'ajoute une troisième force d'origine biologique : la succion exercée par les racines des végétaux. On distingue trois fractions aqueuses dans le sol :

- *L'eau libre* : caractérisée par une circulation rapide, cette dernière n'est que très peu disponible pour la biomasse végétale mais, en revanche, elle alimente les nappes phréatiques souterraines;
- *L'eau retenue* : disponible pour l'absorption racinaire, elle est retenue plus ou moins longtemps par capillarité dans les pores édaphiques inférieurs à  $10\ \mu\text{m}$ ;
- *L'eau liée ou eau d'imbibition* : elle constitue une phase liée aux particules colloïdales (principalement argileuses). Les colloïdes constituent une base gélatineuse dont la forte surface spécifique leur confère une affinité pour l'eau avec laquelle elle s'organise sous forme micellaire.

Les principaux colloïdes du sol sont les argiles (80%), l'humus (5%), la silice (5%) (colloïdes électronégatifs), les hydroxydes de fer et d'aluminium (10%) (colloïdes électropositifs). La capacité d'un sol à retenir l'eau dépendra ainsi de sa composition en colloïdes.

Les propriétés physico-chimiques de l'eau lui confèrent plusieurs rôles dans le sol, telle que la régulation de la température ou le transport, puisqu'elle constitue un système d'échange des particules et des éléments dissous.

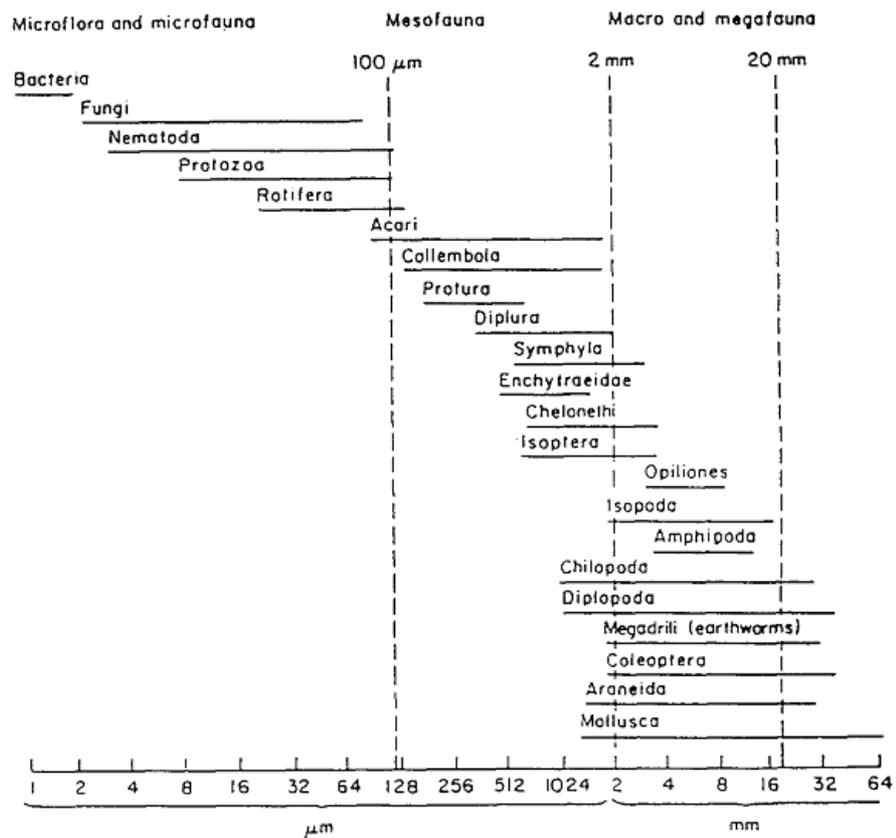


Figure A-5 : macro et microflore du sol réparties selon leur taille (Beare *et al.*, 1995).

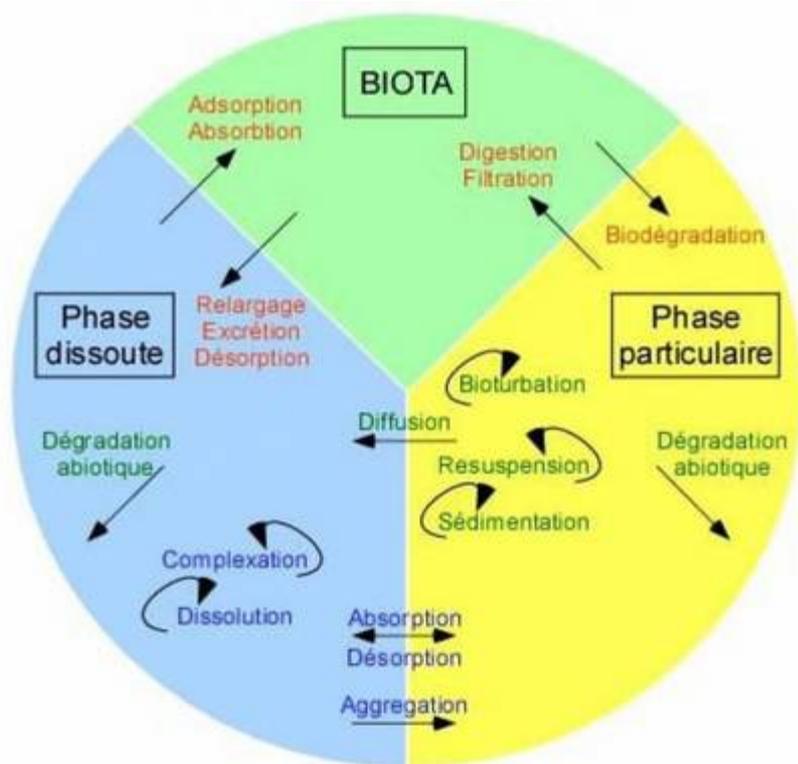


Figure A- 6 : principaux processus contrôlant le cycle des contaminants (Bonnet, 2000).

## 1.2 Les fonctions du sol

### 1.2.1 Influence sur la qualité de l'atmosphère

Car impliqué dans les cycles biogéochimiques (carbone et azote), le sol influe significativement sur la composition de l'atmosphère. Néanmoins, nous nous focaliserons plutôt dans cette partie sur son rôle de biotope et de filtre afin d'aborder les problématiques inhérentes au sujet.

### 1.2.2 Lieu de vie et réservoir de diversité génétique

Le sol abrite 80% de la biomasse du globe et compte une formidable biodiversité (Figure A-5). Outre les lombrics, les fourmis et les termites, il accueille des millions d'êtres vivants. Sur une épaisseur de 30 centimètres, il recèle en moyenne 25 tonnes d'organismes à l'hectare dont 40% de bactéries (réparties entre plusieurs milliers d'espèces), 40% de champignons, 16% de vers de terre et 4% d'organismes divers. On estime aujourd'hui qu'entre 0,1 et 10% des microorganismes sont décrits. Ils constituent un formidable réservoir de diversité biologique hébergeant des ressources génétiques inestimables.

### 1.2.3 Rôle épurateur

Le sol constitue un récepteur, un accumulateur, et un capteur de polluants (Robert and Juste, 1999). A ce titre, il constitue un filtre pouvant remplir des fonctions d'épuration et cette fonction a récemment été identifiée comme un des services écosystémiques remplis par le sol (Millenium Assessment). Ainsi, le sol est souvent qualifié de zone tampon entre l'atmosphère et les aquifères sous-jacentes. Les particules polluantes peuvent ainsi être transmises vers l'atmosphère par volatilisation ou vers les ressources en eau au travers de processus tels que le ruissellement ou l'érosion (Lecomte *et al.*, 1997). Plus les particules seront fines et plus les pores du sol qu'elles occuperont seront réduites (McDowell-Boyer *et al.*, 1986).

Le rôle épurateur des sols dépend principalement de deux processus :

- l'adsorption, dont l'intensité est liée aux caractéristiques intrinsèques du sol et représente la capacité du sol à adsorber et stocker des polluants sous forme de résidus liés. L'intensité de l'adsorption du sol dépendra de la présence d'argile et de matières organiques;
- la biodégradation, dont l'efficacité est liée à l'abondance et à l'activité de populations microbiennes, est la capacité du sol à transformer des polluants et, de manière ultime, à les minéraliser (Figure A-6).

Ces deux propriétés font que le sol peut être considéré comme un filtre sélectif : le phénomène d'adsorption a pour effet de retenir les polluants en fonction de leurs paramètres physico-chimiques. Si ce processus empêche les particules polluantes de gagner les eaux souterraines, il ralentit également leur biodisponibilité et par conséquent leur biodégradation. Il pose aussi la

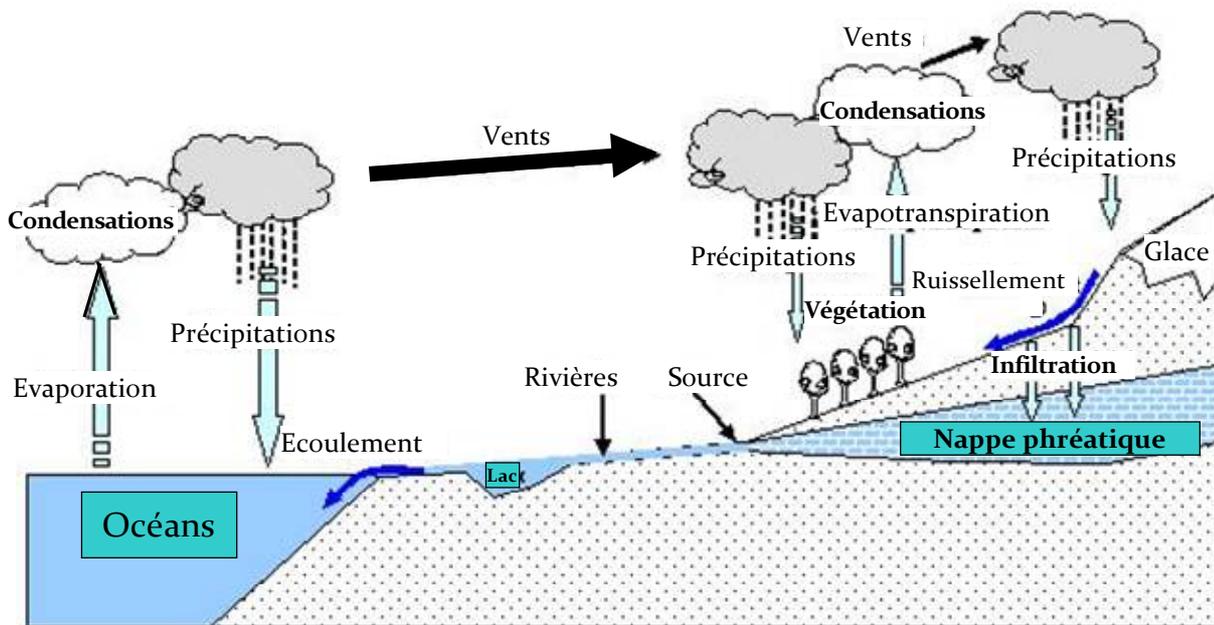


Figure A-7 : le cycle de l'eau.

problématique des résidus liés dont le devenir reste un sujet débattu au sein de la communauté scientifique, certains auteurs prétendant qu'ils pourraient être une source de pollution différée des ressources en eau. La persistance inattendue de pesticides dans les zones aquifères, et ce malgré l'interdiction de leur usage, tend à renforcer cette hypothèse.

Le sol peut aussi être considéré comme un bioréacteur capable de transformer les polluants. Le sol héberge une grande quantité de microorganismes, qui pour certains d'entre eux, résistent et tirent même profit du polluant, l'utilisant comme une source de nutriments et d'énergie pour leur croissance, avantage sélectif considérable dans un environnement oligotrophique tel que le sol. On définit un sol comme oligotrophe car pauvre en éléments organiques nutritifs, nécessaires à la croissance.

Le rôle épurateur du sol constitue une fonction écosystémique essentielle à la protection de notre environnement, à la gestion des déchets (plan d'épandage des lisiers, des boues de station d'épuration...), à la préservation de la qualité des nappes phréatiques.

Depuis la révolution industrielle, la quantité de polluants organiques aux propriétés xénobiotiques n'a cessé de croître, mettant, de fait, la capacité épuratrice du sol à rude épreuve.

### 1.3 Pollutions du sol

Depuis un siècle, les sols sont soumis à l'exposition grandissante à différents polluants (exposition ponctuelle ou chronique) résultant d'activités industrielles (éléments traces métalliques, HAPs), de la gestion des déchets (épandage des boues dont l'utilisation est réglementée par la Directive 86/278/CEE du Conseil du 12 juin 1986) et des pratiques agricoles (engrais et pesticides). Le devenir de ces contaminants organiques dans les sols dépend de trois processus fondamentaux : la rétention, le transfert, la volatilisation et la dégradation.

- Le phénomène de rétention caractérise l'ensemble des interactions entre particules dissoutes et fraction minérale et organique du sol. Le devenir d'un polluant dans le sol dépendra donc de ses capacités à interagir avec d'autres particules. La chélation, phénomène d'emprisonnement de molécules par un chélateur, est à l'origine de l'augmentation du temps de résidence d'un produit dans le sol.
- Le transfert d'une molécule est lié au cycle de l'eau (Figure A-7) : l'eau est à l'origine de la lixiviation, un phénomène physique d'entraînement des eaux de surface jusqu'aux eaux souterraines.

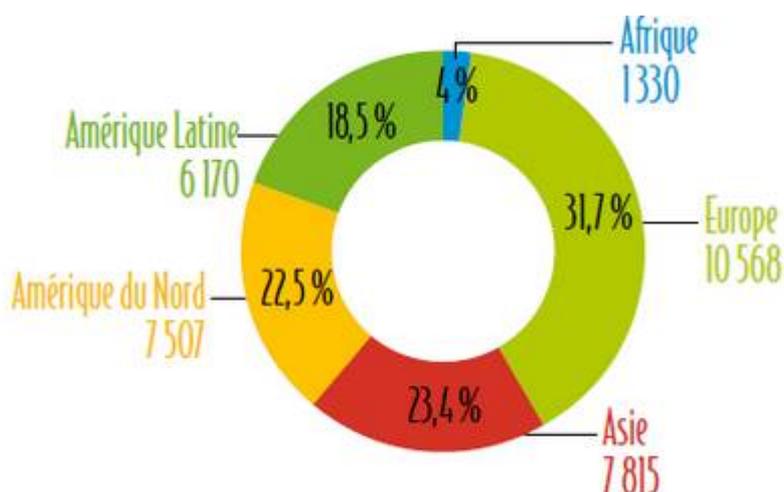


Figure A- 8 : marché mondial (en millions d'euros) des produits phytosanitaires en 2006 (d'après l'UIPP rapport annuel 2007).

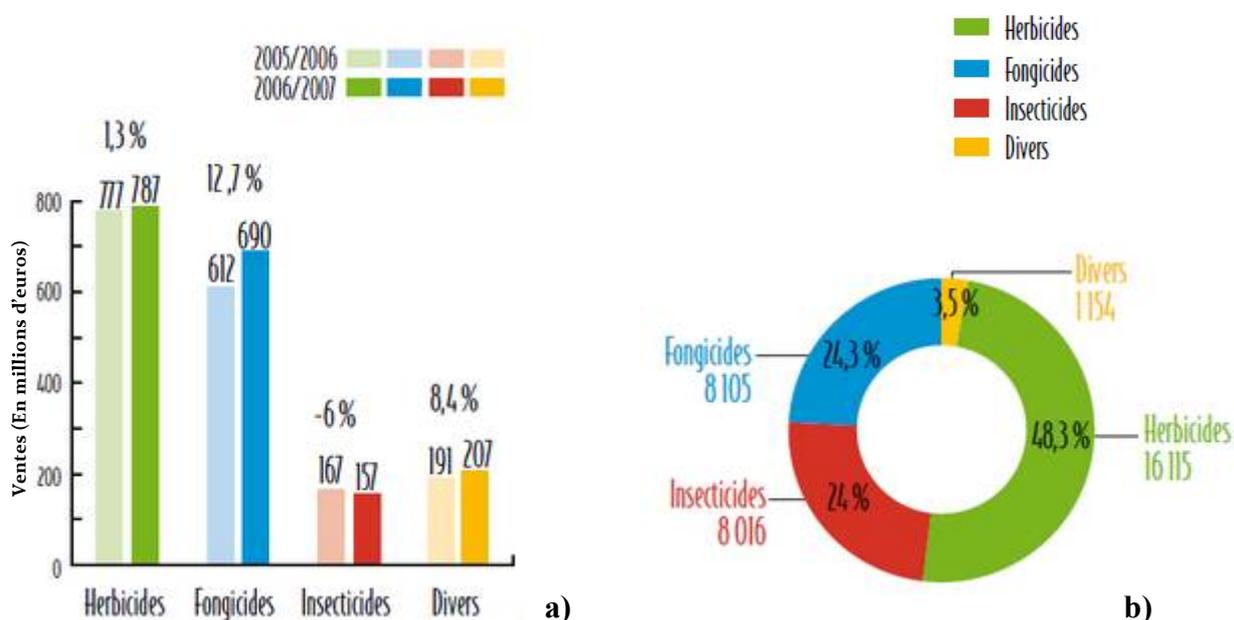


Figure A-9 : a) évolution du marché des produits phytosanitaires (en millions d'euros) en Europe depuis 2005 ; b) Marché mondial en 2006 (d'après l'UIPP, rapport annuel 2007).

Tableau A-I : utilisation des pesticides en fonction des cultures (d'après l'UIPP).

Cultures	Occupation du territoire et consommation de pesticides pour quelques espèces (données 2000, sources SCEES, UIPP)		
	%SAU (arrondi)	Consommation phytos (en % du total)	Remarques
Céréales à paille	24 %	40%	60% fongicides 35% herbicides
Mais	7 %	10%	75 % herbicides
Colza	4 %	9%	
Vigne	3 %	20%	80 % fongicides
<b>Ensemble</b>	<b>38 %</b>	<b>79%</b>	

- La volatilisation : il s'agit du passage d'une molécule à l'état gazeux, processus modélisé par la constante de Henry. Ses effets sont d'autant plus forts lorsque le produit est appliqué par pulvérisation (de pesticides par exemple). Dans ce cas, ce phénomène peut s'avérer être très important en terme de pourcentage d'intrants volatilisés (Glotfelty *et al.*, 1984).
- La dégradation des intrants pourra être d'origine biotique ou abiotique et aboutira à une modification partielle ou totale de la molécule.

Les produits phytosanitaires utilisés dans tous les pays du monde (Figure A-8) dont l'homologation est régie par la directive cadre européenne 91/414/CEE du 15/07/91 sont au centre de nombreuses recherches, parmi eux un groupe très important : les pesticides.

## 2. Les pesticides

On définit en tant que pesticides les substances ou les préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries. Ces biocides regroupent les produits antiparasitaires à usages humains et vétérinaires, les herbicides, insecticides et fongicides ces trois derniers restants les plus employés (Figure A-9). Leur utilisation varie en fonction du type végétal et ce en lien avec son métabolisme (Tableau A-I).

Leur utilisation est régie par quatre directives cadres ([www.observatoire-pesticides.gouv.fr](http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr)). La directive cadre sur l'eau (DCE) 80/778/EEC (amendée par la directive 98/83/EC) fixe le seuil de potabilité de l'eau à la concentration maximale autorisée à  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  pour une molécule active et à  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  pour la totalité des pesticides détectés dans l'eau. La dernière révision de la DCE a contraint l'UE à ne plus uniquement considérer la question de la potabilité de l'eau mais aussi « le bon statut écologique des masses d'eau ». Les pays membres de l'Union Européenne devront se conformer à cette nouvelle réglementation d'ici à 2018. Dans ce contexte réglementaire, en France, le Grenelle de l'Environnement a contribué à la mise en place du plan Ecophyto 2018 pour atteindre cet objectif ambitieux.

Historiquement, l'utilisation de molécules naturelles aux propriétés phytosanitaires remonte à l'antiquité avec notamment l'utilisation d'extraits de plantes (nicotine, pyrèthre,...) ou d'huiles minérales pour contrôler le développement de pestes dans les greniers à grains (Batish *et al.*, 2008).

# Le monde des herbicides : selon la classification HRAC liée au mode d'action

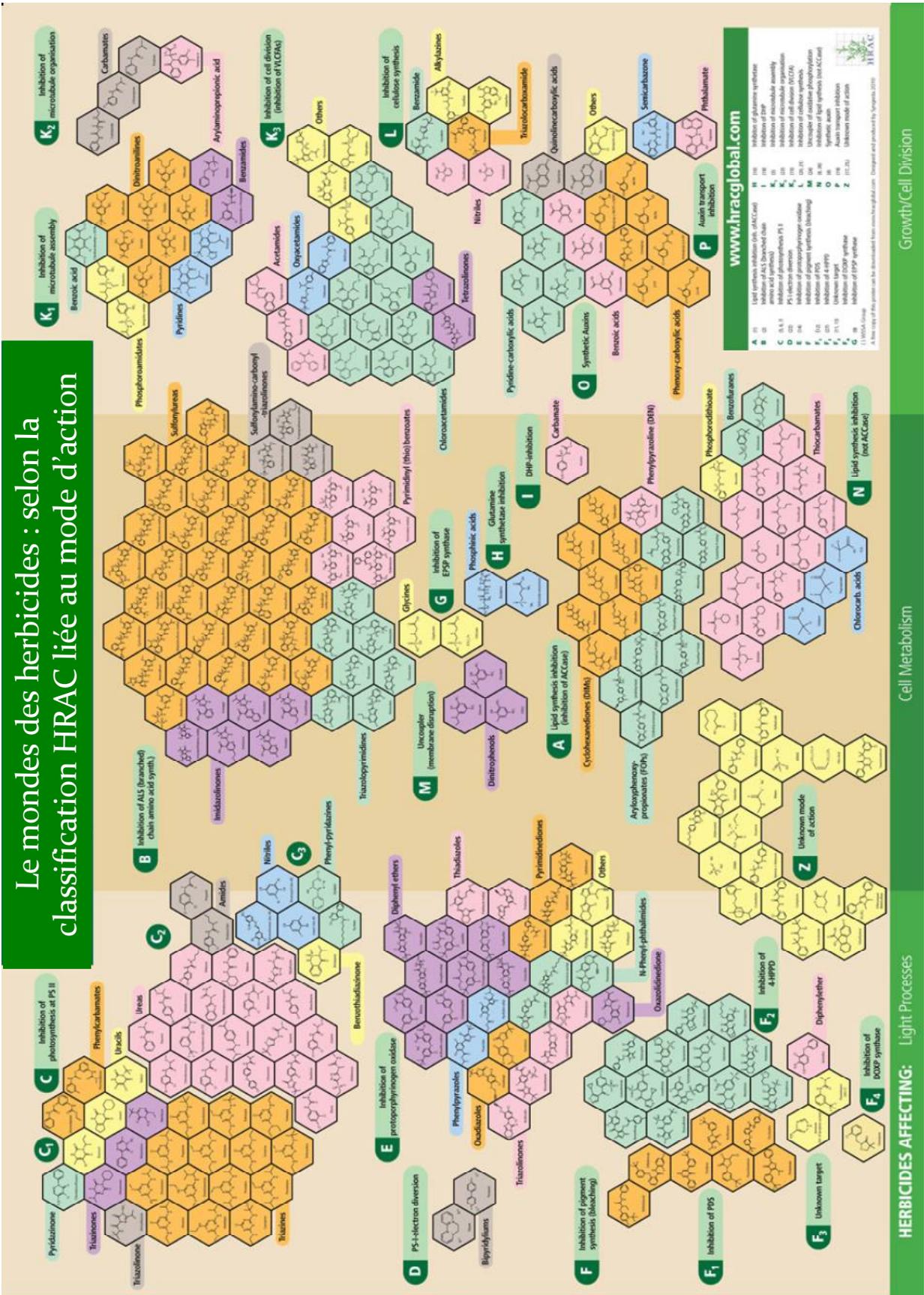


Figure A-10 : classification des herbicides selon leur mode d'action (HARC).

Cependant avec la révolution industrielle et les progrès de la chimie minérale, l'utilisation de préparations à base d'éléments traces métalliques (notamment le cuivre avec la bouillie bordelaise, 1878), s'est développée à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle.

Ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale que le développement de la chimie organique permettra la production et l'utilisation en masse de pesticides qui, couplée à la mécanisation de l'agriculture contribuera à la révolution verte avec les conséquences que nous connaissons maintenant sur la qualité de l'environnement et sur la santé animale.

En 2010, environ 67 900 tonnes de produit de synthèse ont été vendues en France (UIPP rapport d'activité 2010), chiffre qui était de 80000 en 2006 dont 24000 tonnes d'herbicides (IUPP, données 2002).

L'utilisation en agriculture d'herbicides (environ 60% des produits phytosanitaires commercialisés), de fongicides (30% des produits phytosanitaires commercialisés), et d'insecticides (10% des produits phytosanitaires commercialisés) permet, respectivement, le contrôle du développement des plantes adventices, de populations fongiques phyto-pathogènes et d'insectes ravageurs dans les cultures. Actuellement 508 pesticides bénéficient d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en Europe (EU pesticides Database).

## 2.1 Les herbicides

Parmi les pesticides, ceux destinés à endiguer le développement des plantes adventices n'ayant pas de vocation agronomique et entrant en concurrence avec les espèces cultivées sont les herbicides dont il existe une grande variété (Figure A-10). En France, un des premiers herbicides employé dans les cultures céréalières à été le dinitro-ortho-crésol en 1934 mais aussi un des premiers à avoir été identifié comme dangereux pour la santé (Bidstrup and Payne, 1951).

D'une grande diversité, la classe des herbicides est en général celle la plus utilisée. Dans les pays émergents (notamment l'Inde ou la Chine) leur usage continue à augmenter. De plus, nombreuses sont les molécules utilisées qui n'ont pas fait l'objet de tests d'homologation ou dont l'usage est interdit dans d'autres pays. En revanche, aux Etats-Unis et en France, la quantité d'herbicides vendus, en termes de tonnage, a diminué depuis les années 90. Cette diminution est la conséquence d'une plus grande efficacité des molécules et de la culture OGM.

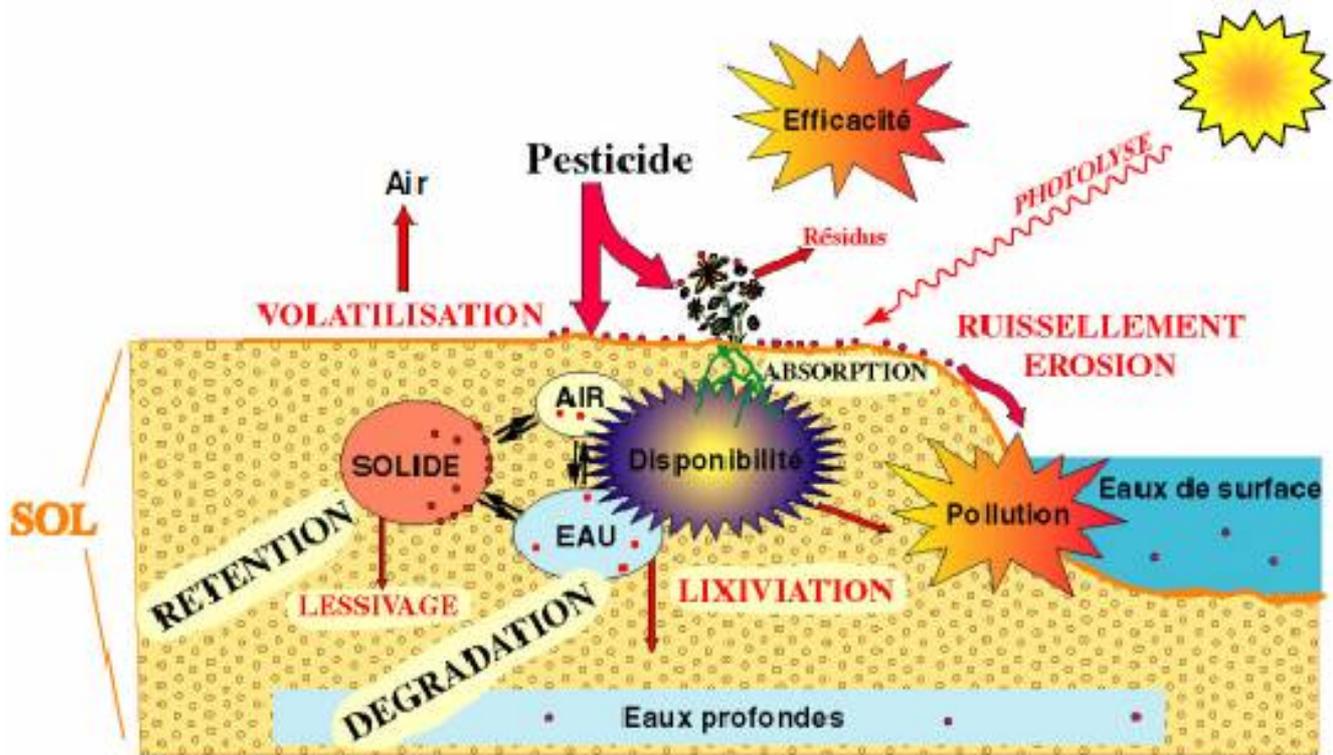


Figure A-11: Processus impliqués dans le devenir des pesticides dans les sols et conditionnant leur disponibilité et par conséquent leur efficacité d'un point de vue phytosanitaire ainsi que leur caractère polluant (Barriuso *et al.*, 1997).

Quelle que soit la nature de la molécule organique, une fois qu'elle a intégré le compartiment édaphique, elle est soumise à de nombreuses réactions abiotiques (liées à la structure et la texture du sol) et biotiques (Figure A-11).

a) Devenir des pesticides dans le sol : le phénomène d'adsorption

Une partie des molécules parvenant aux premiers horizons édaphiques va y être maintenue par des liaisons avec des éléments de la fraction minérale ou organique. Certaines interactions peuvent être très durables, notamment dans le cas de formation de liaisons covalentes contribuant à la formation de résidus liés.

Fonction de la structure particulière du sol, le phénomène d'adsorption résulte de la propriété que possèdent certaines fractions du sol à fixer différents solutés de façon réversible *via* différents types d'interactions qui divergent par leur intensité. Le soluté peut être une molécule neutre ou une espèce ionique et le processus peut avoir lieu au niveau des macropores ou micropores du milieu (Calvet, 1989).

Les particules du sol les plus impliquées dans l'adsorption sont la matière organique et les argiles à la surface desquelles les interactions peuvent être variées : Van der Waals, covalentes, interactions hydrophobes, liaisons hydrogène, échanges de ligands.

La désorption est le phénomène inverse et se produit lorsque la concentration en ligand (pesticide) de la solution du sol diminue. La désorption entre en jeu afin de rétablir la concentration initiale. On peut de ce fait considérer le sol comme un réservoir de contaminants pouvant contribuer à une pollution ultra-différée. Toutefois, même si d'un point de vue théorique ce phénomène est connu, son intensité reste un sujet de discussion. Cette question est une des problématiques principales que vont devoir traiter les gestionnaires des ressources en eau pour atteindre le bon statut écologique des masses d'eau en 2018, conformément à la réglementation européenne. En effet, en matière de pesticides, l'engagement 129 du Grenelle de l'environnement prévoit « l'objectif de réduction de moitié des usages des pesticides en accélérant la diffusion des méthodes alternatives et sous réserve de leur mise au point »

Les pesticides font partie des types moléculaires particulièrement soumis à l'adsorption laquelle est fonction de la teneur en matière organique du sol (Barriuso *et al.*, 1997).

Tableau A-II : valeurs des  $K_{oc}$  observés pour différents pesticides (Jury *et al.*, 1987).

Molécule	$K_{oc}$ ( $m^3 \cdot kg^{-1}$ )
Alachlore	0,12
Aldicarbe	0,036
Atrazine	0,16
Bromacil	0,072
Captan	0,033
Carbaryl	0,229
Carbofuran	0,028
Chlordane	38
Chlorthalonil	1,38
Chlorpyrifos	6,07
Chlortal dimethyl	4
Cyanazine	0,168
2,4-D	0,02
DBCP	0,07
DDT	240
Diazinon	0,085
Dicamba	0,0022
Dichloropropene	0,068
Dieldrin	12
Disulfoton	1,6
Diuron	0,38
EDB	0,044
EPTC	0,28
Ethoprophos	0,12

Molécule	$K_{oc}$ ( $m^3 \cdot kg^{-1}$ )
Fonofos	0,068
Heptachlor	24
Lindane	1,3
Linuron	0,863
Malathion	1,796
Methyl parathion	5,1
Metolachlore	0,181
Metribuzine	0,024
Monuron	0,18
Napropamide	0,3
Oxamyl	0,006
Parathion	11
Penthachlorophenol	14,29
Phorate	0,66
Picloram	0,048
Prometryne	0,61
Propachlore	0,42
Propylene dichloride	0,043
Simazine	0,14
2,4,5-T	0,08
Terbacil	0,041
Toxaphene	21
Triallate	3,6
Trifluraline	7,3

## b) Evaluation du potentiel d'adsorption des herbicides

Il est possible de déterminer la propension qu'aura une molécule phytosanitaire à s'adsorber sur un sol. Pour ce faire, des coefficients modélisant le comportement du pesticide dans les sols ont été conçus :

- le  $K_{ow}$  : le coefficient de partage octanol/eau permet d'évaluer, d'une part, la polarité d'une molécule puisqu'il constitue la mesure de la proportion de pesticides se répartissant entre la phase aqueuse (eau) et la phase organique (octanol).

Mais étant donné la proximité de la polarité de l'octanol avec les membranes phospholipidiques des organismes vivants, il permet, d'autre part, de fournir une estimation du potentiel de bioaccumulation d'un pesticide (Noble, 1993).

- le  $K_d$  : le coefficient de partage sol/eau permet de caractériser le différentiel de concentration en pesticide entre la phase solide et la phase aqueuse en estimant la quantité de molécules adsorbées ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) et de molécules dans la phase aqueuse ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

- le  $K_{oc}$  : est défini comme étant le ratio entre la quantité de pesticides adsorbés par unité de poids de matière organique (Lyman, 1990) et varie en fonction des molécules (Tableau A-II). Ce coefficient de partage eau/matière organique est calculé en fonction du  $K_d$  (spécifique du pesticide) et du pourcentage en matière organique du sol (FOC) selon l'équation fournie ci-après :

$$\mathbf{K_{oc}=K_d/FOC}$$

Il permet de prévoir les modalités de l'adsorption et de la désorption d'un pesticide dans un sol donné en fonction de sa teneur en matière organique.

- le logarithme du  $K_{oc}$  permet d'obtenir le coefficient de ralentissement ( $R$ ) qui exprime le différentiel de vitesse de migration du pesticide par rapport à celui de l'eau dans le sol (Barriuso, 2004). Cette valeur, dépendante des apports d'eau dans le sol, variera d'une année à l'autre.

Ces différents paramètres, constituant une partie des données fournies par les firmes dans le dossier d'homologation, permettent de prévoir le comportement d'un pesticide dans différents sols. Toutefois, on remarquera que ces paramètres ne prennent pas en compte pas le compartiment biologique du sol hébergeant notamment les communautés microbiennes connues pour modifier la spéciation des pesticides (transformation, accumulation...).

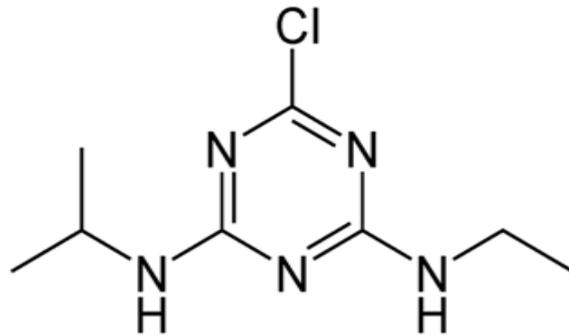


Figure A-12: structure chimique de l'atrazine.

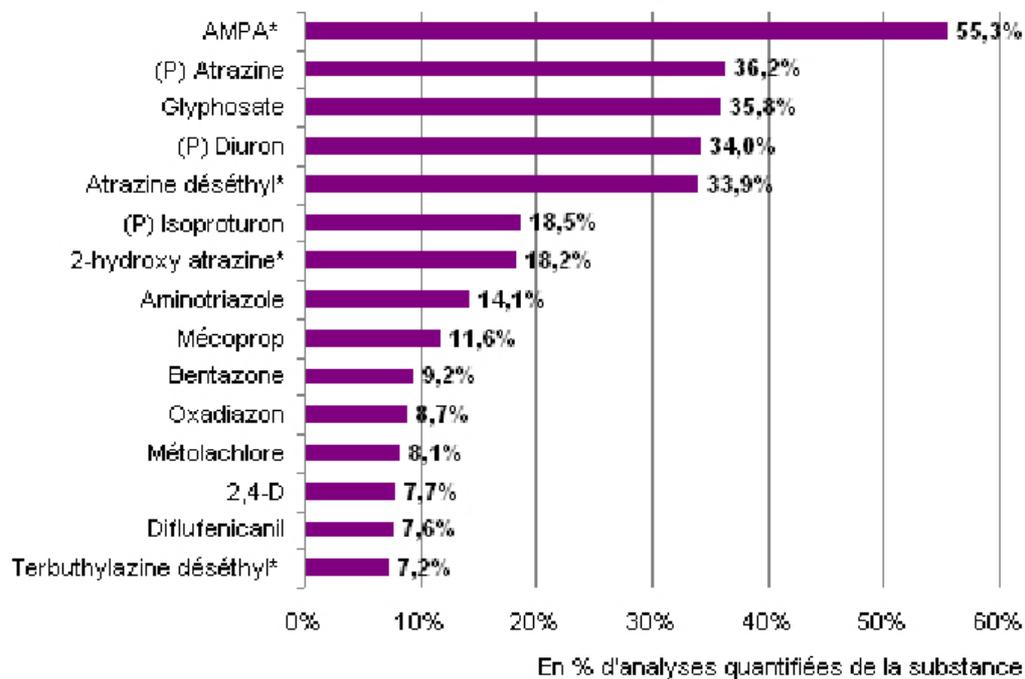


Figure A-13 : liste des principaux pesticides et métabolites détectés dans les eaux de surface (Enquête IFEN n°9, décembre 2007, données 2005).



Figure A-14 : les formes isomériques des triazines.

## 2.2 L'atrazine

L'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-*s*-triazine) (n°CAS : 1912-24-9) (Figure A-12) est un herbicide appartenant à la famille des *s*-triazines. Cette famille est caractérisée par la présence d'un hétérocycle à six éléments contenant trois atomes d'azote et de carbone. L'atrazine est l'un des herbicides les plus utilisés en Amérique du Nord pour contrôler la prolifération de plantes adventices notamment dans les cultures de maïs et de sorgho. Le mode d'action de l'atrazine réside dans l'inhibition de la photosynthèse en raison de l'arrêt du transfert d'électrons du photosystème (PS) I au PS II. Malgré une solubilité dans l'eau relativement faible (33 mg L<sup>-1</sup>) associée à un potentiel d'adsorption particulière peu important, cet herbicide contamine fréquemment les ressources en eau (Scribner *et al.*, 2000) (Figure A-13). Cette contamination *quasi* généralisée des ressources en eau est probablement la résultante de la récalcitrance de cet herbicide.

### 2.2.1 Caractéristiques moléculaires et physico-chimiques de l'atrazine

#### a) Nomenclature et structure chimique

L'atrazine, de masse molaire 213,69 g mol<sup>-1</sup>, est une des molécules herbicides appartenant à la famille des *s*-triazines formées d'hétérocycles aromatiques hexagonaux. Le cycle est dit aromatique en raison de l'alternance de liaisons simples et doubles, conséquence d'un partage d'électron avec l'atome voisin selon une liaison  $\pi$ , liaison qui se délocalisera en permanence conférant stabilité et propriétés particulières à la molécule.

Il existe trois isomères de constitution du noyau *s*-triazine selon la position relative des atomes sur le cycle. L'un d'entre eux, le 1,3,5 triazine ou *s*-triazine (ou le -*s*- signifie symétrique, étant donné l'agencement des atomes sur le cycle) constitue le noyau de l'atrazine (Figure A-14).

L'atrazine ne constitue pas l'unique membre de la famille *s*-triazines, puisque l'on y retrouve les aminotriazines (mélamine), les trihydroxytriazine (acide cyanurique) et les aminohydroxytriazines (amméline) pour ne citer qu'eux (Dupayrat, 1970). Comme précisé dans la nomenclature IUPAC, chaque atome de carbone du cycle aromatique de l'atrazine porte un substituant : un chlore pour le C<sub>2</sub>, une éthylamine pour le C<sub>4</sub> et une isopropylamine pour le C<sub>6</sub>.

#### b) Propriétés physico-chimiques

L'atrazine peut être considérée comme une base faible étant donnée sa constante d'acidité égale à 1,68 (Stipičević *et al.*, 2009). Sa température de fusion est comprise entre 175 et 177

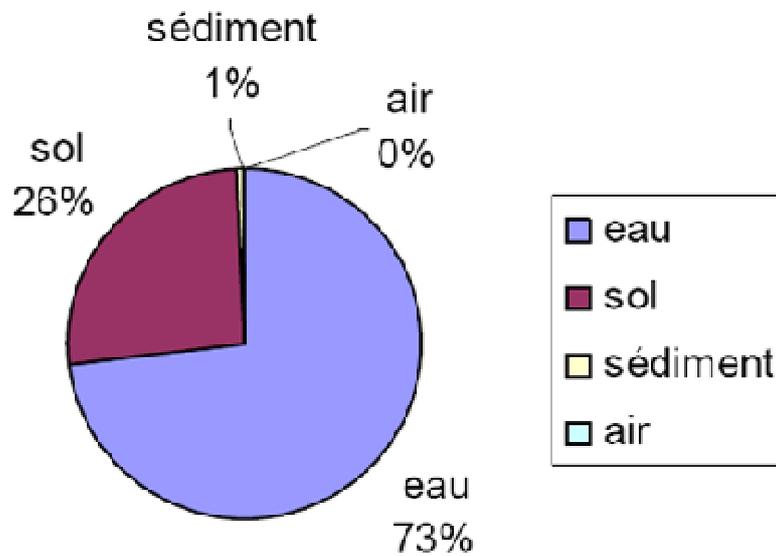


Figure A-15 : répartition de l'atrazine dans les différents compartiments de la biosphère (Tissier *et al.*, 2005).

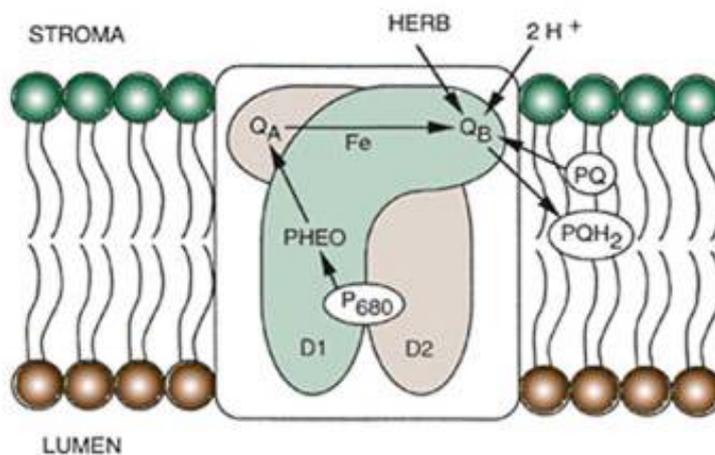


Figure A-16 : inhibition du photosystème II par la molécule d'atrazine. Le flux d'électrons est bloqué lorsque l'atrazine occupe le domaine de fixation de la protéine QB.

degrés Celsius. Elle présente une faible volatilité (sa constante de Henry est égale à  $0,0026 \text{ Pascal.m}^3.\text{mol}^{-1}$ ). Son coefficient de partage octanol/eau est égale à 2,75 ( $\log K_{OW}$ ), valeur qui permet plus précisément d'appréhender son degré d'hydrophobicité indiquant une molécule plutôt hydrophobe (Cohen *et al.*, 1984). En raison de la présence du noyau *s*-triazinique, l'atrazine absorbe dans les UV et est en conséquence sensible à la photodégradation. Les propriétés structurales physico-chimiques de l'atrazine définissent son comportement. Ainsi, l'atrazine est bioaccumulable dans les tissus organiques (Tang *et al.*, 1998; Jacomini *et al.*, 2006), et n'est en revanche pas bioamplifiable le long de la chaîne alimentaire (Solomon *et al.*, 1996). La demi-vie de la molécule fluctuera selon diverses conditions environnementales et biologiques et la plupart des études rapporte des demi-vies comprises entre quelques jours (Kolpin and Kalkhoff, 1993) et plusieurs mois (Frank and Siron, 1985). Ces paramètres physico-chimiques expliquent sa répartition dans les différents compartiments de la biosphère (Figure A-15).

#### c) L'atrazine : un inhibiteur de la photosynthèse

L'atrazine, une fois absorbée principalement par voie foliaire et dans une moindre mesure par voie racinaire, *via* la voie xylémienne, gagne la membrane thylakoïdienne des chloroplastes, siège de l'activité photosynthétique.

La plastoquinone  $Q_A$  est un des premiers récepteurs d'électrons de la chaîne de transfert et sert d'intermédiaire entre la chlorophylle et  $Q_B$  (Kern and Renger, 2007). Le mode d'action de l'atrazine réside dans l'inhibition du PSII : en se fixant au site de liaison de la plastoquinone B sur la protéine D1 (plastoquinone réductase), il bloque le transfert d'électrons entre  $Q_A$  et  $Q_B$ . (Jansen *et al.*, 1993) (Figure A-16). Cette inhibition compétitive stoppe alors le transfert d'électrons et empêche l'activité photosynthétique entraînant la mort des plantes adventices sensibles. Mais la totalité des espèces ne sont pas sensibles, ce qui justifie son appellation d'herbicide sélectif. Par exemple le maïs, une des cultures sur laquelle l'atrazine est utilisée, est capable de résister à l'effet herbicide de cette dernière.

Cette résistance est liée au fait que le maïs synthétise une molécule allélopathique stockée dans la vacuole ; le 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) responsable de l'hydrolyse de l'atrazine en hydroxyatrazine (Raveton *et al.*, 1997). La demi-vie du DIMBOA est de 24h (Sicker *et al.*, 2000). Dans les feuilles, la Glutathion-S-Transférane assure la désactivation de l'atrazine en se conjuguant au niveau du C2 (Hatton *et al.*, 1996). Notons que des systèmes de résistance identiques ou similaires existent chez d'autres espèces sur lesquelles l'atrazine est utilisée.



#### d) Utilisation et législation

L'atrazine est appliquée par pulvérisation en pré-levée ou en post-levée à des taux variant entre 1,12 et 2,24 kg ha<sup>-1</sup> (Alvey and Crowley, 1995).

L'atrazine, dont l'usage a été homologué en 1959 à raison de 5 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>, a dans un premier temps été limitée à 2,5 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>. Puis, face à la problématique environnementale résultant de son importante utilisation, cette dernière a été limitée à 1 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> en 1997 s'accompagnant d'une restriction d'usage géographique en zones non agricoles (avis JO du 4 juillet 1997). Son interdiction définitive prend effet en 2003 (JO n° 275 du 27 novembre 2001 : NOR : AGRGO1022290V) « *Cette substance active est interdite par la décision 2004/141/CE à la suite de l'examen relatif à l'inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE : non inscrite à la directive 2004/247/CE du JOCE L78 du 10/03/2004* ».

Bien que la mise sur le marché des pesticides soit soumise à une autorisation de mise sur le marché (AMM) et bien que les recommandations préconisées par les firmes et les sociétés de protection de végétaux soient, le plus souvent, respectées par les agriculteurs, leur usage généralisé cause de graves problèmes de pollution diffuse des différents compartiments de l'environnement (Enquête IFEN n°9, décembre 2007 données 2005). Aussi, la gestion du devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement est devenue une problématique environnementale majeure. L'atrazine, bien qu'interdite en France depuis 2003, est toujours détectée dans 36,2% des eaux de surface. De plus, un de ses principaux métabolites, la dééthylatrazine, est détectée dans 79,4% des cours d'eau étudiés en 1997 (Agence de l'eau, données 2007).

#### e) Aspects toxicologiques

L'atrazine est classée comme nocive (« risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée par ingestion » (Fiche données techniques Stähler ®)) et selon l'EPA (Environmental Protection Agency, USA) considérée non cancérigène pour l'homme. La Dose Létale 50 (DL50) de l'atrazine est de 3080 mg kg<sup>-1</sup> chez le rat ce qui constitue une valeur peu significative en termes de toxicité immédiate. La motivation de son interdiction relève du principe de précaution étant donnée la multiplication des études prouvant sa présence *quasi* systématique dans l'eau. En effet, dès 1999, des arrêtés préfectoraux préconisent son interdiction sur certaines communes afin de limiter les dépassements de seuils fixés pour les eaux superficielles (Tissut *et al.*, 2006). Néanmoins, des études scientifiques récentes mettent en avant des données suggérant des effets délétères chez les mammifères et les organismes aquatiques. En effet, des perturbations



endocriennes et des effets tératogènes de l'atrazine ont été observés chez *Xenopus laevis* (Hecker *et al.*, 2005), perturbations pouvant même induire un changement de sexe chez cette même espèce (Hayes *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2010). De plus, des incidences en terme d'écotoxicité (tendance à la génotoxicité chez *Pecten maximus*) et à la cytotoxicité (inhibition de la prolifération de cellules ovariennes) ont été observées (Le Pennec and Le Pennec, 2001; Kmetič *et al.*, 2008). Notons qu'en revanche une étude n'ayant pas noté d'effets extrêmement significatifs sur 3 espèces d'amphibiens conclut à la non implication de l'atrazine dans la diminution du nombre de batraciens (Allran and Karasov, 2001).

## 2.2.2 Devenir de l'atrazine dans l'environnement

### a) Dynamique de l'atrazine dans les sols

Les grandeurs physico-chimiques clefs de la dynamique de l'atrazine dans le sol sont liées à sa charge, sa constante d'acidité, sa constante d'ionisation et sa solubilité (Moreau-Kervévan and Mouvet, 1998). Le  $K_d$  de l'atrazine varie selon l'origine géographique des sols entre 0,61 et 1,70 (Coquet, 2003). Ainsi, pour l'atrazine, la valeur du  $K_{oc}$  est comprise entre  $0,6 \text{ g mL}^{-1}$  dans le sable à plus de  $21 \text{ g mL}^{-1}$  dans la tourbe (Pesticide Properties Database) correspondant à un potentiel d'adsorption de faible à modéré (Brouwer *et al.*, 1990).

Le coefficient de ralentissement ( $R$ ) de l'atrazine était égal à 0,38 UA en 1992. On peut comparer cette valeur à celle d'un pesticide plus mobile, le métolachlor pour qui  $R$  était égal à 0,48 la même année (Weber *et al.*, 2007). On peut ainsi qualifier l'atrazine de relativement mobile dans les sols agricoles et en conséquence ayant une propension à lixivier vers les eaux souterraines.

Néanmoins les  $K_d$ ,  $K_{oc}$  et  $R$  de l'atrazine sont directement corrélés à la teneur en matière organique de la phase solide. Ainsi, la sorption et la mobilité de cet herbicide dépendront du type de sol. L'atrazine ayant un  $pK_A$  plutôt faible, les interactions avec la matière organique du sol et l'argile seront la résultante d'interactions hydrophobes. L'atrazine peut également interagir avec les argiles par le biais de liaisons de Van der Waals ou de liaisons hydrogènes (articulées au niveau de ses atomes d'azotes) (Weber *et al.*, 1969). Au regard des valeurs indiquées précédemment on pourrait alors se demander pourquoi des traces d'atrazine, relativement mobile et facilement adsorbable sont encore très fréquemment détectées de nos jours alors que cet herbicide est interdit d'usage depuis 2003. Dans le sol, l'atrazine peut interagir fortement avec les acides humiques (Kulikova and Perminova, 2002) et subir des modifications moléculaires, contribuant à la formation de résidus liés la rendant fortement liée à certaines fractions du sol et accroissant

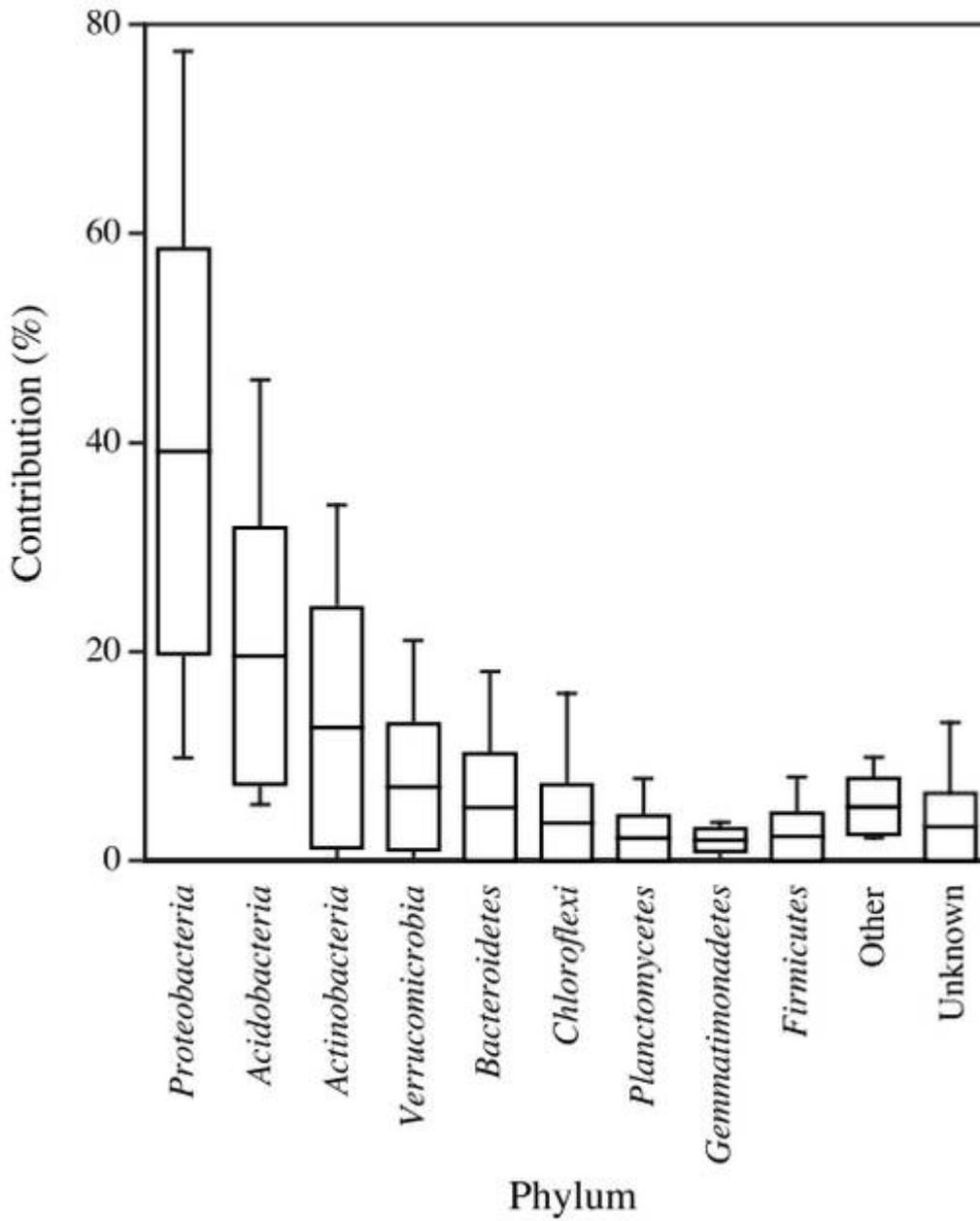


Figure A-17 : contribution des ARNr 16S des différents membres de différents *phyla* de la communauté bactérienne du sol (Janssen, 2006).

ainsi sa persistance pouvant contribuer à la pollution ultra-différée de l'environnement (Barriuso *et al.*, 1991).

b) Les facteurs environnementaux influençant la dynamique de l'atrazine dans le sol

Le pH : la constante d'acidité du sol va constituer un des premiers paramètres physico-chimiques capable de modifier les processus de sorption de l'atrazine (Clay and Koskinen, 1990). En effet, une étude réalisée sur des sols riches en acides organiques (humiques) a démontré l'augmentation du potentiel d'adsorption d'un facteur 10 dans des conditions de pH décroissant (McGlamery and Slife, 1966). Par ailleurs, l'étude d'Houot *et al.* (1996) conduite sur 22 sols agricoles a clairement montré que les sols présentant un pH inférieur à 6,5 présentaient une faible aptitude à minéraliser l'atrazine alors que les sols présentant un pH supérieur à 7 étaient capables de minéraliser l'atrazine. Ce type d'observation a par ailleurs aussi été rapporté pour d'autres herbicides appartenant à la famille des urées substituées (Hussain *et al.*, 2010).

Matériaux du sol : la présence d'acides humiques est susceptible de favoriser la formation de liaisons covalentes avec la forme oxydée de l'atrazine (McGlamery and Slife, 1966). Néanmoins, malgré sa stabilité moléculaire liée essentiellement au cycle *s*-triazine, l'atrazine peut-être dégradée dans les sols *via* des processus abiotiques ou biotiques.

### **3. Les bactéries dans le sol**

#### **3. 1 Biodiversité microbienne du sol**

##### **3.1.1 Phylogénie**

Dans la systématique bactérienne, le développement du séquençage de la sous-unité 16S de l'opéron ribosomique bactérien a permis d'établir un répertoire de plus en plus exhaustif de la diversité bactérienne (Pace, 1997). Par ailleurs, le développement de techniques de biologie moléculaire basées sur l'extraction directe des acides nucléiques de matrices environnementales et leur analyse par PCR a permis de s'affranchir de la barrière de la cultivabilité bactérienne (Rappé and Giovannoni, 2003b). La diversité bactérienne édaphique est immense puisqu'on estime de  $10^5$  à  $10^7$  le nombre d'espèces dans un gramme de sol (Torsvik *et al.*, 1990). Par ailleurs, au-delà de la diversité, les populations microbiennes présentent une très forte densité comprise entre  $10^6$  et  $1,5 \cdot 10^{10}$  (Torsvik *et al.*, 1990). A ce titre, le sol, ressource non renouvelable à l'échelle humaine, constitue un patrimoine pour l'humanité et représente l'un des plus importants réservoirs génétique de la biosphère. Ces travaux ont permis de montrer que 32 *phyla* peuvent être détectés dans les sols à des abondances diverses (Figure A-17).

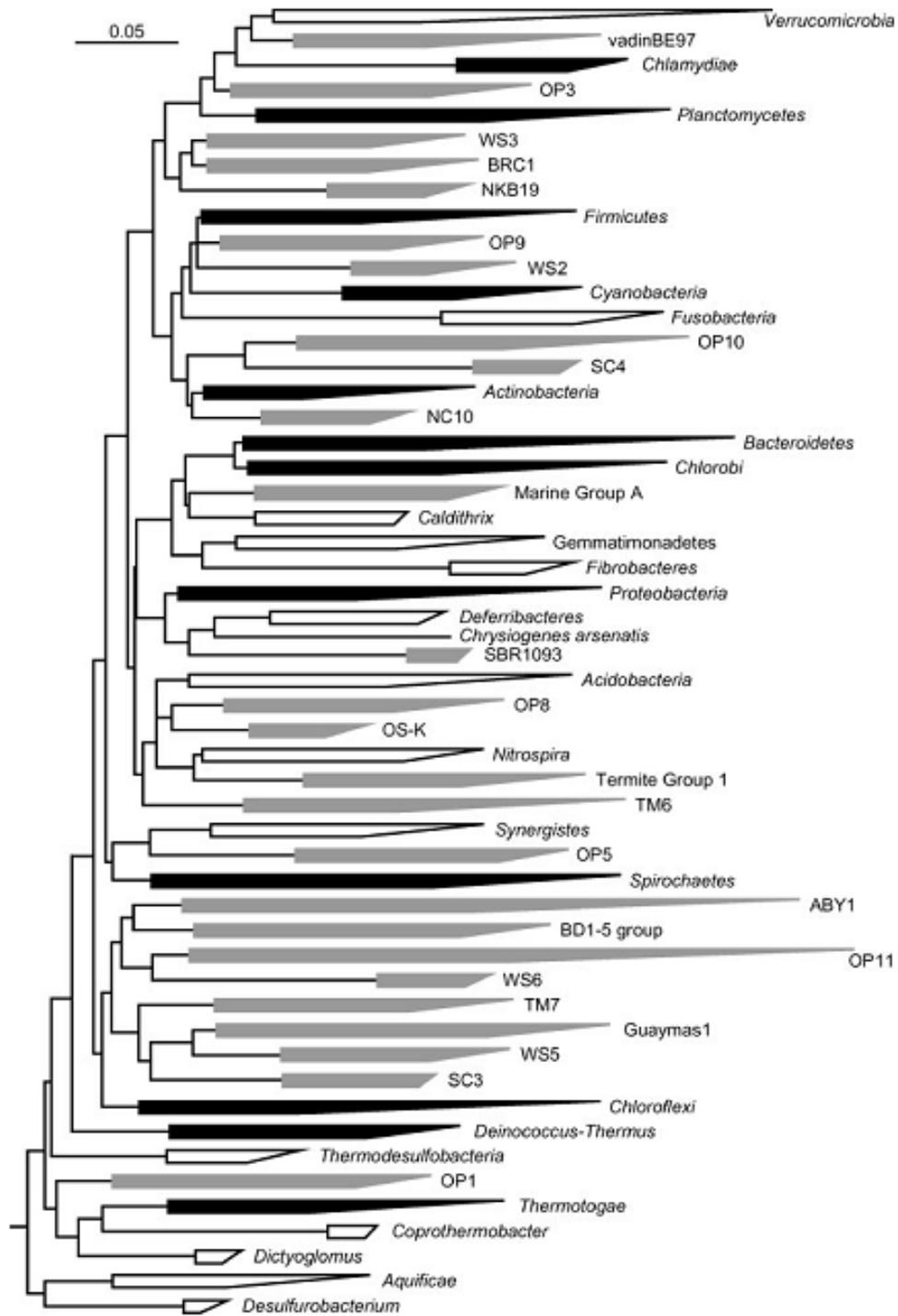


Figure A-18 : arbre phylogénétique des grands groupes bactériens. Les groupes entiers sans représentants cultivables sont représentés en gris (Rappé and Giovannoni, 2003).

Neuf *phyla* sont généralement dominants : les Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, et les Firmicutes (Janssen, 2006).

Les caractéristiques physico-chimiques d'un sol, résultant des conditions environnementales et de la pédogénèse, sont des paramètres proximaux influençant la prévalence de phylotypes bactériens. Ainsi, de nombreuses études d'écologie microbienne ont tenté de corrélérer la diversité microbienne avec les différents types édaphiques (Borneman *et al.*, 1996; Borneman and Triplett, 1997; Chandler *et al.*, 1998).

Ces dernières années, ces études ont connu d'importants développements afin de définir des inventaires microbiens de la diversité microbienne des sols. Les travaux conduits au sein de l'UMR MSE par l'équipe de Lionel Ranjard visent à établir un référentiel de la diversité microbienne à l'échelle du territoire français. Ces travaux ont récemment été étendus à l'échelle européenne au travers du programme européen Ecofinders coordonné par Philippe Lemanceau.

### 3.1.2 Fonctionnelle

La classification bactérienne peut être effectuée selon différents critères. Outre la nomenclature phylogénique basée sur la proximité génétique (Figure A-18), un autre mode de classement est basé sur les caractéristiques métaboliques des bactéries. Depuis les années 70, la notion de classification polyphasique, tenant compte entre autres des aspects génétiques et phénotypiques, est de plus en plus utilisée et permet une classification complète.

Le mode de tri fonctionnel basé sur le mode respiratoire (aérobie/anaérobie), la source carbonée (autotrophie/hétérotrophie) et azotée (assimilation/dissimilation) de microorganismes appartenant à divers groupes fonctionnels, est employé pour définir des « groupes fonctionnels clefs » (Lavelle *et al.*, 1997; Swift *et al.*, 2004). Cette classification fait fi de l'horloge moléculaire basée sur l'analyse de séquences conservées telles que l'ARNr 16S. Elle montre que des populations microbiennes appartenant à des *phyla* distincts peuvent présenter des convergences métaboliques et des fonctions similaires dans l'environnement. Ces observations sont à l'origine du concept de redondance fonctionnelle. Le développement de nombreuses techniques de biologie moléculaire ont récemment permis de définir des marqueurs fonctionnels caractérisant différentes voies métaboliques de populations microbiennes (Torsvik and Øvreås, 2002; Geets *et al.*, 2007). Ces outils ont permis de décrire l'abondance et la diversité spécifique de communautés bactériennes fonctionnelles dans les sols. Même si la question de la diversité bactérienne reste un sujet de discussion, le sens courant la qualifie comme une assurance du bon fonctionnement du

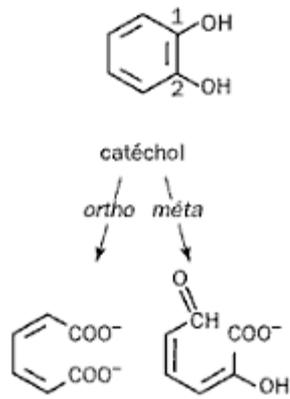


Figure A-19 : voie de dégradation du catéchol aboutissant à la formation de  $\beta$  céto-adipates dont l'étape suivante est la formation d'acétyl-CoA et de succinate. Chez les bactéries, les gènes codants les enzymes catalysant cette dégradation sont principalement chromosomiques (Pelmont, 2005).

sol. Le concept d'assurance écologique, reposant pour partie sur celui de la redondance fonctionnelle, tend à suggérer qu'un haut niveau de diversité constitue une garantie du fonctionnement des sols. De nombreuses études montrent que les pressions d'origines anthropiques, et notamment l'évolution des pratiques culturales conventionnelles ayant recours aux intrants chimiques (engrais et pesticides) et organiques (boues STEP, lisier,...), ont causé des perturbations affectant l'abondance, la diversité et l'activité des populations microbiennes (Martin-Laurent *et al.*, 2004). La question aujourd'hui consiste à définir la gamme de variation naturelle de ces paramètres afin de définir leur « *normal operation range* » et en conséquence, de fixer les seuils en deçà desquels le fonctionnement du sol est menacé. Le projet Ecofinders s'est fixé ces deux objectifs en prospectant à l'échelle européenne le niveau de diversité microbienne des sols.

### 3.2 La biodégradation bactérienne des pesticides

La plasticité du génome bactérien a favorisé l'acquisition de fonctions cataboliques leur permettant d'utiliser une grande variété de composés organiques (Dua *et al.*, 2002). Ainsi, les bactéries du sol sont capables de dégrader des composés phénoliques naturels en complément des dégradants primaires : la voie des  $\beta$ -cétoadipates (Figure A-19) constitue une plateforme catabolique de dégradation de ces composés phénoliques. Des gènes de cette voie catabolique sont très souvent recrutés dans des voies de dégradation de composés xénobiotiques. De nombreuses voies métaboliques se sont développées avec une complexité adaptée aux caractéristiques des différents xénobiotiques, comme le nombre de cycles ou encore la nature des fonctions chimiques portées par les squelettes carbonés.

#### *Une application biotechnologique : la bioremédiation*

On définit par le terme bioremédiation le traitement des sols pollués avec des organismes vivants capables de venir à bout des polluants. On parle de phytoremédiation lorsque des plantes sont utilisées pour pomper des métaux lourds accumulés dans les sols. La bioremédiation microbienne consiste à utiliser des microorganismes présentant des capacités métaboliques à l'origine de la transformation de polluants. Parmi les approches de bioremédiation microbienne, la bioaugmentation consiste à apporter une population microbienne présentant une capacité métabolique sur des sols contaminés. Le traitement des sols pollués par bioaugmentation nécessite une bonne connaissance des capacités métaboliques des microorganismes susceptibles d'être exploités dans ce procédé. Les informations moléculaires classiques comme l'organisation génétique, la séquence des gènes cataboliques ou la caractérisation cinétique des enzymes cataboliques sont indispensables pour un premier niveau de compréhension. Ces connaissances

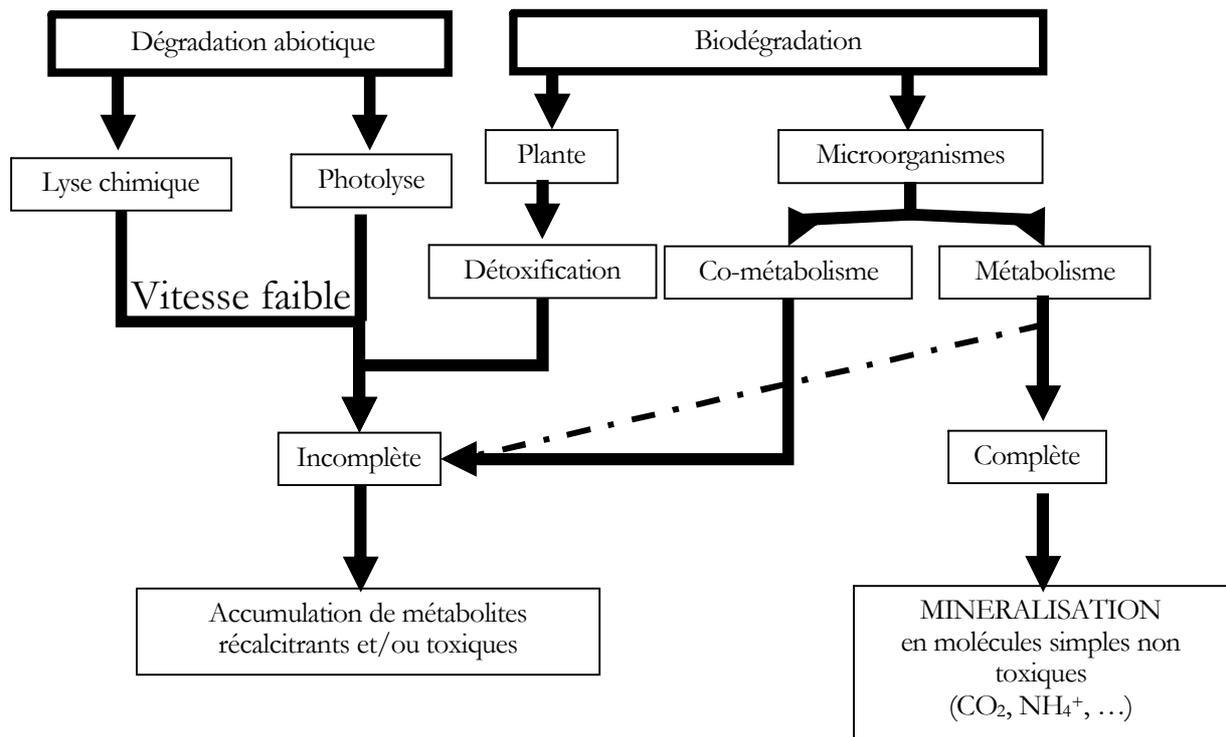


Figure A-20 : voies de dégradation biotique et abiotique des pesticides.

doivent cependant être impérativement complétées par des notions plus généralistes concernant par exemple les possibilités d'évolution de ces activités en fonction de facteurs génétiques internes ou propres à l'environnement extérieur. Pour une pollution donnée, il sera ainsi possible de sélectionner les souches les plus actives métaboliquement tout en minimisant leur impact sur l'écosystème à décontaminer. Les travaux s'intéressant à la caractérisation des souches présentes dans les sols pollués et aux voies métaboliques mises en jeu dans la dégradation des herbicides dans ces sols participent donc à une meilleure compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes et notamment de ses capacités de résilience (capacités d'adaptation, de métabolisation, d'évolution).

### 3.3 La dégradation de l'atrazine dans l'environnement

#### 3.3.1 Dégradation abiotique

L'atrazine, comme la plupart des pesticides, peut être dégradée par des processus abiotiques (Figure A-20) ;

La dégradation chimique de l'atrazine est le fruit de plusieurs mécanismes :

- la photocatalyse est possible, mais dans le sol, elle ne s'effectue que dans les premiers millimètres (mm) de l'horizon édaphique ou dans l'eau. En effet, l'atrazine peut être dégradée par les UV (notamment les longueurs d'ondes inférieures à 300 nm) à pH compris entre 6 et 8 (Comber, 1999).
- L'hydrolyse, quant à elle, n'est efficace que dans les sols dont le pH est inférieur à 7 et conduit à l'accumulation de métabolites N-déalkylés.

Dans le sol, la dégradation des pesticides est principalement assurée par des microorganismes. La biodégradation des pesticides par la microflore du sol est assurée par deux voies cataboliques (Soulas and Lagacherie, 2001).

#### 3.3.2 Dégradation biotique

##### a) Voie co-métabolique

La première est la voie co-métabolique pour laquelle une population microbienne ou un *consortium* microbien (association de plusieurs microorganismes) assure une ou plusieurs modifications structurales du pesticide sans l'utiliser comme source principale de carbone et d'énergie. Dans ce cas, la biodégradation est réalisée fortuitement par des enzymes à large spectre telles que les

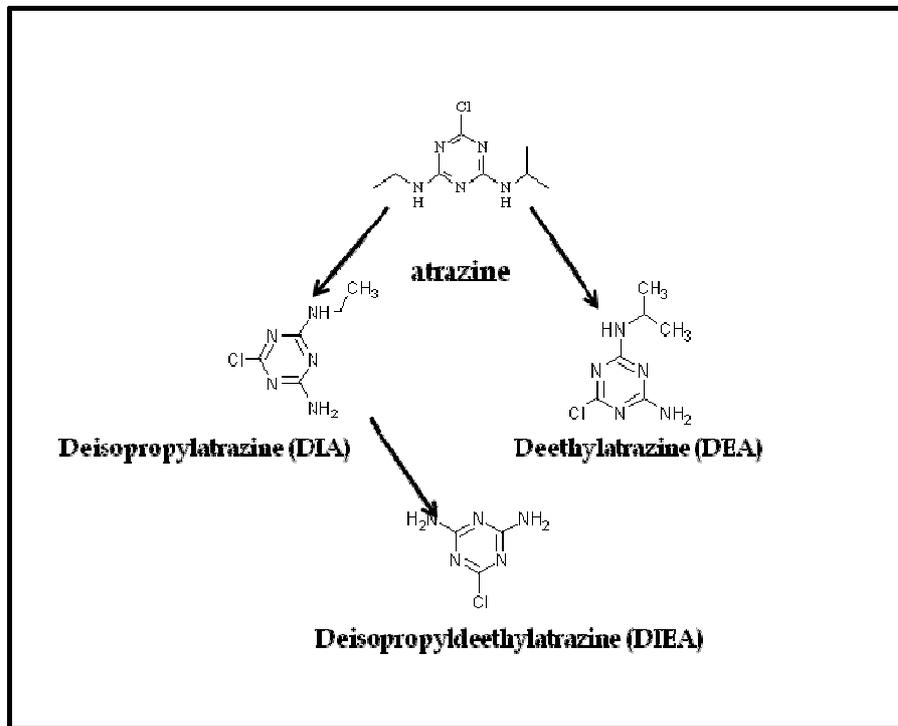


Figure A-21 : les intermédiaires métaboliques de la dégradation co-métabolique de l'atrazine : DEA (déséthylatrazine), DIA (désisopropylatrazine), DEIA (déséthyl-désisopropylatrazine).

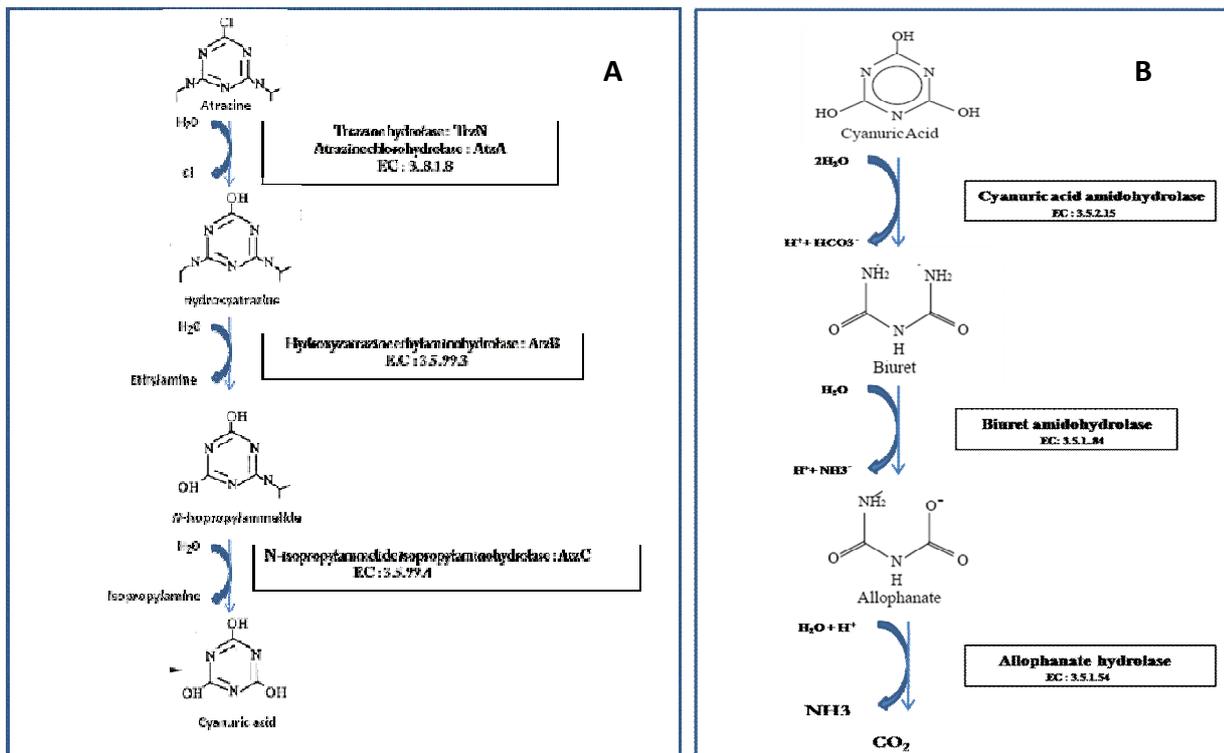


Figure A-22 : voie métabolique de la dégradation de l'atrazine ; A : voie haute ; B : voie basse.

oxygénases ou le cytochrome P450 qui sont, par ailleurs, impliqués dans la détoxification du milieu intracellulaire des bactéries (Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

A noter que cette voie peut être le fait d'un *consortium* bactérien, fongique ou mixte. Elle aboutit à une dégradation incomplète du pesticide conduisant à l'accumulation de métabolites déalkylés sans que le cycle *s*-triazinique ne soit altéré (Figure A-21).

b) La minéralisation : dégradation complète de l'atrazine

Dans le cas de la dégradation métabolique, les populations dégradantes utilisent l'atrazine comme une source d'azote et d'énergie pour leur croissance. La minéralisation complète de l'atrazine est réalisée par des microorganismes possédant l'ensemble des gènes codant les enzymes cataboliques impliquées. Il a été montré que l'application répétée d'herbicide (par exemple : atrazine, isoproturon, 2,4-D) exerçait une pression de sélection sur les populations microbiennes du sol qui conduit à leur adaptation, et à l'apparition du phénomène de biodégradation accélérée (BDA) (c'est-à-dire à l'acquisition du potentiel génétique codant des enzymes cataboliques spécifiques) (Barriuso and Houot, 1996; Vallaeys *et al.*, 1996; El-Sebai *et al.*, 2005). Les études suggèrent que le « climax » de la fonction de BDA est atteint lorsqu'une population microbienne acquiert l'ensemble du potentiel génétique dégradant. Toutefois, de récents travaux montrent que des *consortia* bactériens partageant leur potentiel de dégradation sont capables de minéraliser l'atrazine remettant de fait cette hypothèse en cause (Smith *et al.*, 2005; Udiković Kolić *et al.*, 2008). Ainsi, ces études suggèrent que la coopération métabolique pourrait être une voie existante dans les sols.

Les enzymes impliquées dans la voie de dégradation de l'atrazine sont au nombre de 6. Les trois premières étapes de la dégradation de l'atrazine consistent en 3 hydrolyses catalysées successivement par l'atrazine chlorohydrolase (AtzA) (De Souza *et al.*, 1999), l'hydroxyatrazine éthylaminohydrolase (AtzB) (Boundy-Mills *et al.*, 1997) et la N-isopropyle-ammelide N-isopropylaminohydrolase (AtzC) (Sadowsky *et al.*, 1998). Ces trois enzymes appartiennent à la super-famille des amido-hydrolases métallo-dépendantes.

La voie haute (*atzABC*, upper pathway) catalyse la transformation de l'atrazine en acide cyanurique. Cet intermédiaire catabolique est par la suite transformé en dioxyde de carbone et en ammonium *via* l'action de trois autres enzymes (AtzD, E et F) constituant la voie basse (lower pathway) (Figure A-22). D'un point de vue génétique, AtzA, B, C, D, E et F sont codées par six gènes localisés, chez *Pseudomonas* ADP, sur le plasmide catabolique pADP1 d'environ 100 kb qui porte par ailleurs l'opéron *merABC* codant les enzymes qui pourraient être impliquées dans la

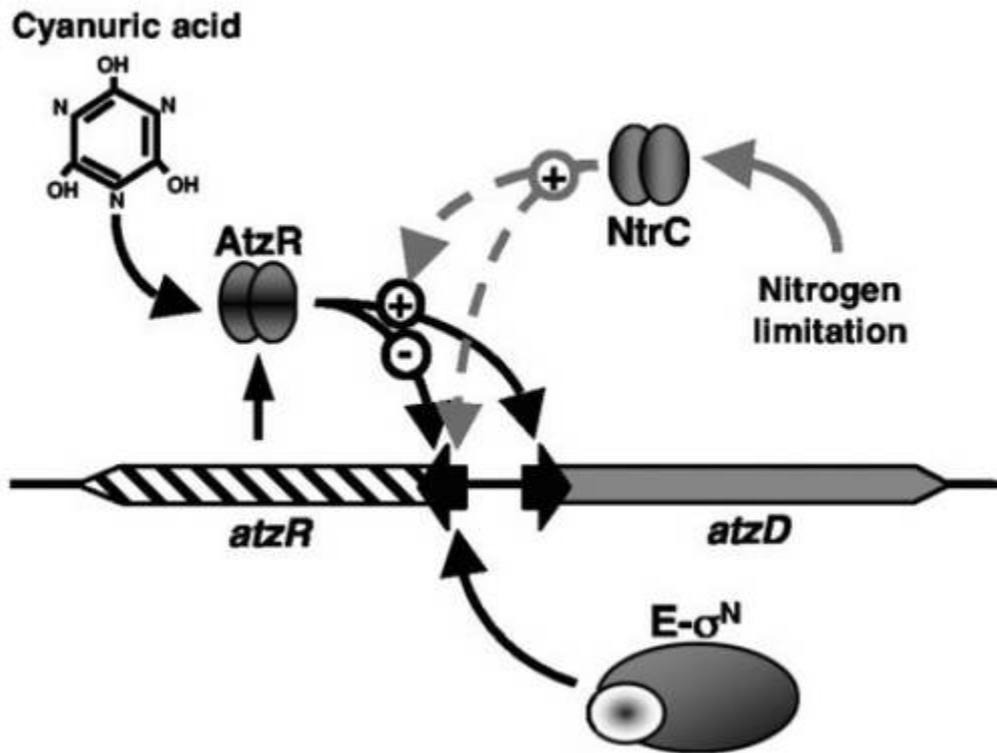


Figure A-23 : régulation de la voie basse (*atzDEF*) par *atzR*. Le schéma montre les régions régulatrices sur l'opéron *atzDEF* (*atzD*), un régulateur de type lys-R (*AtzR*) qui agit positivement en présence d'acide cyanurique sur *atzD* et effectue un rétro-contrôle négatif sur sa propre transcription. Les pointillés indiquent un effet putatif d'une carence en azote (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005).



Figure A-24 : lieux d'isolement des souches bactériennes dégradant l'atrazine à travers le monde.

résistance au mercure. La présence de séquences d'insertion (IS1071 et IS*Pps1*) dans la séquence du plasmide pADP1 et, plus précisément, d'IS flanquants les gènes *atzA* et *atzB* suggère leur implication dans la construction de ce plasmide catabolique par le recrutement de gènes par des recombinaisons homologues. Par ailleurs, les gènes *atzD*, *atzE* et *atzF* de la voie basse sont organisés sous forme d'un pseudo-opéron placé sous la régulation transcriptionnelle d'un facteur de transcription de type *lysR* codé par le gène *atzR* (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005) (Figure A-23). En conditions de laboratoire, le plasmide pADP1 est hautement transférable par conjugaison bactérienne aux bactéries à Gram-négatifs (Martinez *et al.*, 2001). Par ailleurs, des études menées en serre dans des conditions contrôlées ont montré que, dans un sol agricole cultivé avec du maïs, ce plasmide était aussi transférable à des populations bactériennes endogènes (Devers *et al.*, 2005). Cette propriété pourrait en partie expliquer la diffusion des gènes *atz* et *mer* (Martinez *et al.*, 2001) dans les zones contaminées avec l'atrazine. La présence d'éléments d'insertion autour des gènes *atzA* et *atzB*, ainsi que leur localisation sur différents plasmides dans différentes populations bactériennes, suggère qu'ils soient impliqués dans la formation de cette voie catabolique spécialisée (Devers *et al.*, 2008).

Dans le cas de la minéralisation, l'atrazine semble constituer essentiellement une source d'azote (seuls les carbones des chaînes étant incorporés dans la biomasse microbienne). Ceci est lié au fait que le degré d'oxydation des carbones est tel qu'il facilite leur transformation en CO<sub>2</sub>. Les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* ont été retrouvés dans de nombreux microorganismes taxonomiquement différents, isolés de lieux géographiques variés (Figure A-24) et capables de dégrader efficacement l'atrazine (Monard *et al.*, 2011).

La dégradation de l'atrazine par les bactéries porteuses des gènes *atz* peut être favorisée par l'environnement. Par exemple, la dégradation est plus efficace dans la rhizosphère de *Zea mays* (Piutti *et al.*, 2002a; Martin-Laurent *et al.*, 2006).

A ce jour, les différentes séquences nucléotidiques des gènes *atz* décrits à travers le monde présentent une identité comprise entre 97 et 100%, ce qui laisse entrevoir leur émergence récente et un temps de coalescence faible depuis l'ancêtre commun. Le caractère ubiquitaire des gènes *atz* semble être la conséquence de leur diffusion intra et interspécifique dans le monde au sein de la communauté microbienne. Le transfert horizontal de gènes au sein de la communauté microbienne est un phénomène qui a fréquemment été rapporté, notamment concernant la résistance aux antibiotiques ou pour les gènes de dégradation (Courvalin, 1994; Neilson *et al.*, 1994).

**Tableau A-III : Identité des séquences nucléotidiques des gènes *atzA*, *atzB*, *atzC* ou *trzN* entre différentes souches bactériennes dégradant l'atrazine. Le pourcentage d'identité des gènes *atz* est exprimé par rapport à *Pseudomonas* sp. ADP et celui du gène *trzN* par rapport à *Nocardioïdes* sp. C190.**

Microorganisme	Identité (%)				Références
	trzN	atzA	atzB	atzC	
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP		100	100	100	Mandelbaum <i>et al.</i> , 1995
<i>Chelatobacter heintzii</i>		99	98	100	Rousseaux <i>et al.</i> , 2001
Isolat 38/38		99,3	100	99,8	Assat et Turco, 1994
<i>Ralstonia</i> sp. M91-3		99	100	100	De Souza <i>et al.</i> , 1998a
<i>Alcaligenes</i> sp. SG1		99,2	100	100	Devers <i>et al.</i> , 2008
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14		99,1	100	100	Struthers <i>et al.</i> , 1998
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> HIM		99,6	99,5	99,8	Aislabie <i>et al.</i> , 2005
<i>Clavibacter michiganensis</i> ATZ1		100			De Souza <i>et al.</i> , 1998a
<i>Pseudomonas</i> sp. CN1		99			Topp <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudaminobacter</i> sp. C147		99,2			Topp <i>et al.</i> , 2000
<i>Arthrobacter</i> sp. AD1		99,93			Caï <i>et al.</i> , 2003
<i>Arthrobacter cristallopoides</i>			97	100	Rousseaux <i>et al.</i> , 2001
<i>Beta proteobacterium</i> CDB21		99,9	99,8		Iwazaki <i>et al.</i> , 2007
<i>Comamonas</i> sp. A2		99,2	100		Yang <i>et al.</i> , 2010
<i>Nocardioïdes</i> sp. C190	100				Mulbry <i>et al.</i> , 2002
<i>Nocardioïdes</i> sp. SP12	99				Piutti <i>et al.</i> , 2003
<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	100				Sajjaphan <i>et al.</i> , 2004
<i>Nocardia</i> sp.	100				Smith <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas</i> sp. AD 39	99,3				Zheng <i>et al.</i> , 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. AD30	99,4		100	98,8	Zheng <i>et al.</i> , 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. AD25	99,6				Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Nocardioïdes</i> sp. MTD22	99,4				Yamazaki <i>et al.</i> , 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. T3AB1	99,2				Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Nocardioïdes</i> sp AN3	99,2				Yamazaki <i>et al.</i> , 2008
<i>Arthrobacter</i> sp. AD26	99,6		100	98,7	Li <i>et al.</i> , 2007

### 3.4 Organisation des gènes de dégradation de l'atrazine

Les études menées jusqu'à présent semblent indiquer que, d'une part, les souches capables de minéraliser l'atrazine divergent taxonomiquement (Devers *et al.*, 2008). Au-delà de cette divergence taxonomique, elles présentent des potentiels génétiques dégradant divers ( $trzN$ ,  $atzBC$ ,  $atzABCDEF$ ,...) et parfois incomplets suggérant que plusieurs populations coopèrent au sein d'un *consortium* pour minéraliser entièrement l'atrazine (Martin-Laurent *et al.*, 2006). Par ailleurs, ce potentiel génétique n'est pas porté sur les mêmes supports génomiques (plasmide, chromosome). Dernièrement, les études menées avec l'approche « Stable Isotope Probing » (Monard *et al.*, 2011) semblent même indiquer que la plasticité génétique entrevue jusqu'à présent avec des approches classiques pasteurienne était largement sous-estimée.

#### 3.4.1 Variation de la composition génétique du potentiel dégradant

➤ Les gènes  $atz$

Ces gènes, bien que codant des enzymes *a priori* spécifiques de la dégradation de l'atrazine, semblent être ubiquistes dans des sols exposés à cet herbicide puisqu'ils ont été identifiés dans des zones biogéographiques distinctes et présentant de forts taux d'identité (98%) quelle que soit leur provenance (De Souza *et al.*, 1998) (Tableau A-III). Si *Pseudomonas* ADP possède la totalité des gènes regroupés sur un même plasmide (Martinez *et al.*, 2001; Sajjaphan *et al.*, 2004), le potentiel de dégradation peut être également partagé.

➤ Les autres gènes de la dégradation de l'atrazine

-  $trzN$

Le gène  $trzN$  est une alternative à  $atzA$  pour amorcer la déchloration de l'atrazine. Or, dans la littérature, de nombreuses souches ont été identifiées comme porteuses de ce gène, notamment celles nouvellement isolées.

En effet, on retrouve ce gène chez *Nocardia* sp., *Nocardioides* sp. SP12, *Arthrobacter aurescens* TC1 (Mulbry *et al.*, 2002; Piutti *et al.*, 2003a; Smith and Crowley, 2006, Sajjaphan *et al.*, 2004).

Dernièrement, au travers d'une étude biogéographique, Arbeli et Fuentes (2010) ont même émis l'hypothèse selon laquelle ce gène serait prévalent sur le gène  $atzA$  au moins dans le contexte sud-américain.

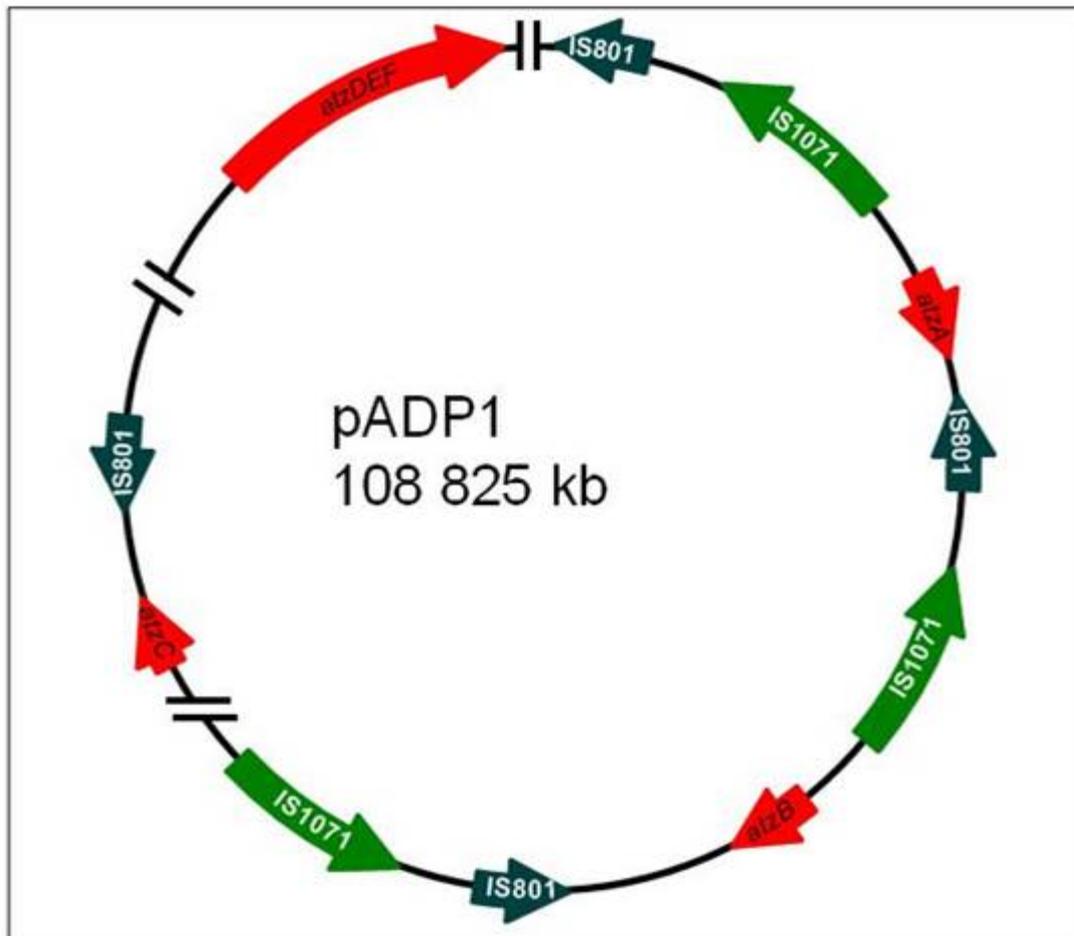


Figure A-25 : carte du plasmide pADP1 de *Pseudomonas* sp. ADP. Les gènes de dégradation *atz* de l'atrazine sont représentés par des flèches rouges ; les IS1071 par des flèches vertes et les IS*Pps1* par des flèches jaunes.

-*trzD*

Il en est de même pour l'analogue d'*atzD*, *trzD* porté par *Chelatobacter heintzii* ou *Pseudomonas* sp. souche NRRLB-12227 (Karns, 1999; Rousseaux *et al.*, 2001).

- gènes co-métaboliques

Un autre gène, *atrA*, s'apparentant à une monooxygénase de type cytochrome P450, est également impliqué dans la N-déalkylation de l'atrazine chez *Rhodococcus* sp. (Shao and Behki, 1995).

D'autres systèmes ont été identifiés tels que l'action du cytochrome P450 de *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 dans la déalkylation de l'atrazine (Nagy *et al.*, 1995).

### 3.4.2 Localisation des gènes

Les gènes dégradant l'atrazine, comme d'ailleurs de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques, sont le plus souvent localisés sur des plasmides (Figure A-25). Des études conduites dans notre laboratoire ont démontré que les gènes de dégradation pouvaient être portés par différents plasmides au sein d'une même souche montrant la diversité des supports génétiques. Par ailleurs, ils sont parfois redondants au sein d'une même souche. D'une part, ces observations reposant sur des Southern blots, et non pas sur des données de séquençage, on ne peut donc vérifier la fonctionnalité des gènes. D'autre part, ils ne sont pas nécessairement toujours localisés sur des plasmides. Ainsi, *Arthrobacter* sp. AD1 a été identifiée comme porteuse d'*atzA* mais sur son chromosome (Cai *et al.*, 2003b).

La totalité des gènes de dégradation permettant la minéralisation complète de l'atrazine n'est pas systématiquement portée par toutes les souches. En effet, certaines ne portent que le début de la voie. Ainsi, *C. michiganensis* ATZ1 ne porte que les deux premiers gènes (*atzA* et *B*) et les deux derniers (*atzE* et *F*) (De Souza *et al.*, 1998). De la même façon, *Chelatobacter heintzii* Cit1 ne porte qu'une partie de la voie soit *atzABC* et *trzD* (Devers *et al.*, 2007a). Toutefois, ayant connaissance des biais liés à la cultivabilité des microorganismes, on est en droit de se demander si ces observations ne sont pas simplement le fruit d'une distorsion méthodologique. Les récents travaux publiés par Monard *et al.* 2011 ayant eu recours au SIP (Stable isotope probing), évitant le biais lié à la cultivabilité des microorganismes dégradant, semblent conforter nos observations sans toutefois les confirmer en raison de l'absence de concordance entre l'analyse phylogénétique basée sur l'analyse de l'ARNr 16S sur les fractions d'ADN enrichis en <sup>13</sup>C provenant de la



dégradation de l'atrazine  $^{13}\text{C}$  et la composition en gènes de dégradation (trop conservés pour pouvoir conduire une analyse phylogénétique pertinente).

Ainsi, entre la variation de la composition du potentiel génétique dégradant et la diversité de sa localisation génomique au sein des différentes souches appartenant à différents taxons microbiens, reposant sur le recrutement des gènes *atz* et *trz* dans des éléments d'insertion d'IS (Devers *et al.*, 2007a), de nombreux types d'organisations sont possibles et soulèvent la question évolutive de l'*optimum* de la fonction de dégradation au sein de la communauté microbienne (Udiković-Kolić *et al.*, 2010).

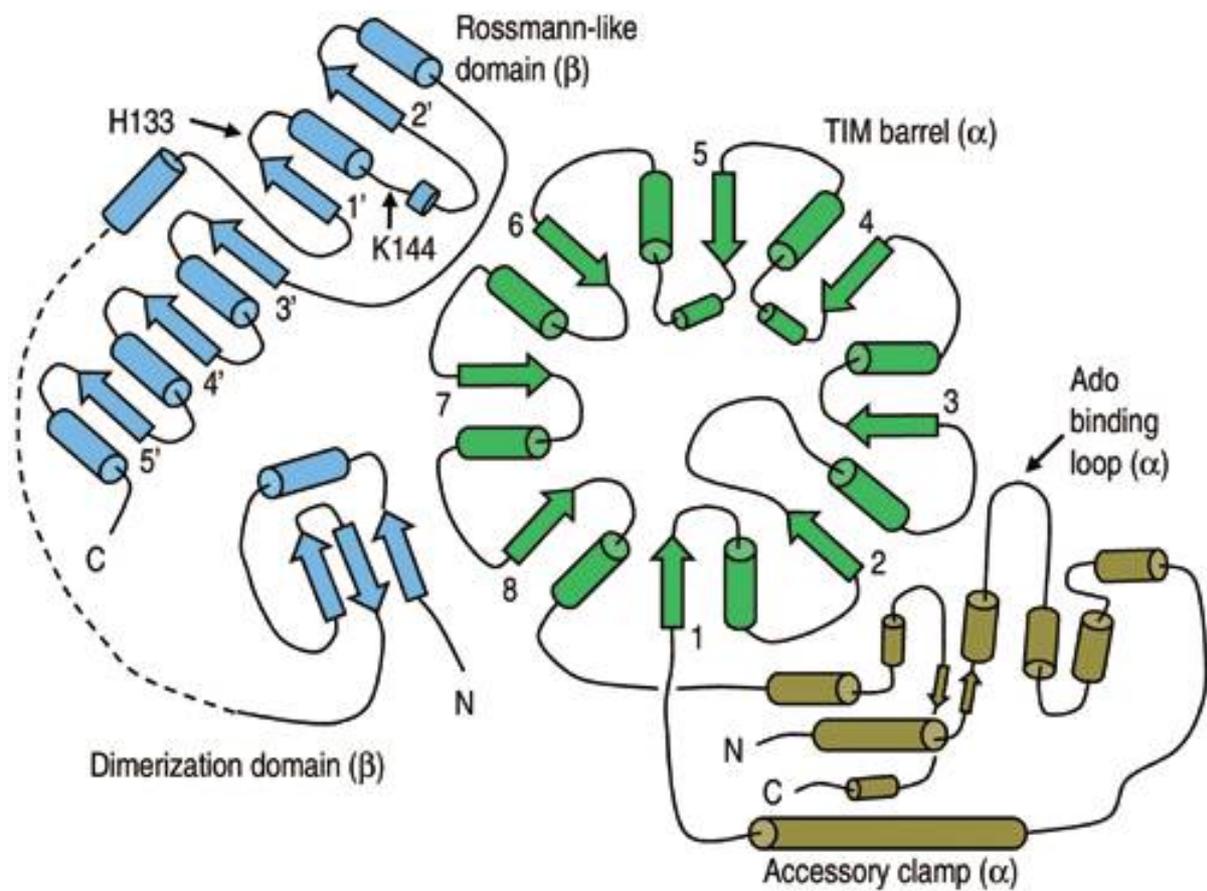


Figure A-26 : structure de la lysine 5,6-aminomutase présentant un tonneau TIM (Berkovitch *et al.*, 2004).

## CHAPITRE II : LES ENZYMES DE LA DEGRADATION DE L'ATRAZINE; ASPECTS BIOCHIMIQUES

L'atrazine peut être dégradée par certaines espèces bactériennes possédant la batterie enzymatique nécessaire et ce, selon plusieurs réactions biochimiques (Mandelbaum *et al.*, 1995). Les enzymes impliquées dans la dégradation de l'atrazine sont des hydrolases.

### 1. Les amido-hydrolases (EC 3)

La classe des hydrolases se subdivise en 13 super-familles selon les types de liaisons hydrolysées. Elle regroupe les déshalogénases (EC 3.8) qui catalysent la rupture de la liaison carbone-chlore (EC 3.8.1) et les amidohydrolases (EC 3.5) qui hydrolysent la liaison carbone-azote. Les réactions d'hydrolyses catalysées par les enzymes appartenant à cette classe répondent à l'équation suivante :  $\mathbf{R-R' + H_2O = R-OH + R'-H}$

Les amidohydrolases constituent une vaste famille enzymatique à l'origine de la catalyse de réactions concernant des acides aminés, des sucres, des acides nucléiques, des organophosphorés et certaines d'entre elles s'associent à des ions métalliques permettant la déprotonation de la molécule d'eau visant à l'attaque nucléophile du substrat. Cette famille inclut l'uréase  $\alpha$ , l'adénosine désaminase, les phosphotriesterases, les dihydroorotases, l'allantoïnase, l'hydantoïnase, l'adénine et la cytosine désaminase, l'imidazolonepropionase, l'aryldialkyl-phosphatase, les chlorohydrolases et les formyl-méthanofurane déhydrogénases. Les amidohydrolases se caractérisent par la présence d'un ion métallique fixé au niveau d'acides aminés enchâssés dans la partie C-terminale formant une structure tertiaire de type tonneau TIM : (tonneau  $(\beta/a)$ -8) (Figure A-26) (Pieper *et al.*, 2009) identifiée pour la première fois dans la structure tridimensionnelle de la triosephosphate isomérase (Lolis *et al.*, 1990). Il s'agit d'un motif polypeptidique dont le cœur est constitué d'une association itérative d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  au nombre de 8 formant un tonneau particulièrement stable (Lesk *et al.*, 1989).

L'équilibre de cette structure tertiaire des amidohydrolases est le résultat de son caractère hydrophobe. Par ailleurs, il a été suggéré que les hélices  $\alpha$  de par leur propriété amphiphile, et dont la face non polaire s'agglutine sur la partie hydrophobe d'une face du feuillet  $\beta$ , sont responsables de l'hydrophobicité de l'intérieur du tonneau puisque tapissé par les chaînes latérales hydrophobes de l'autre face des feuillets  $\beta$  (Nagano *et al.*, 1999).

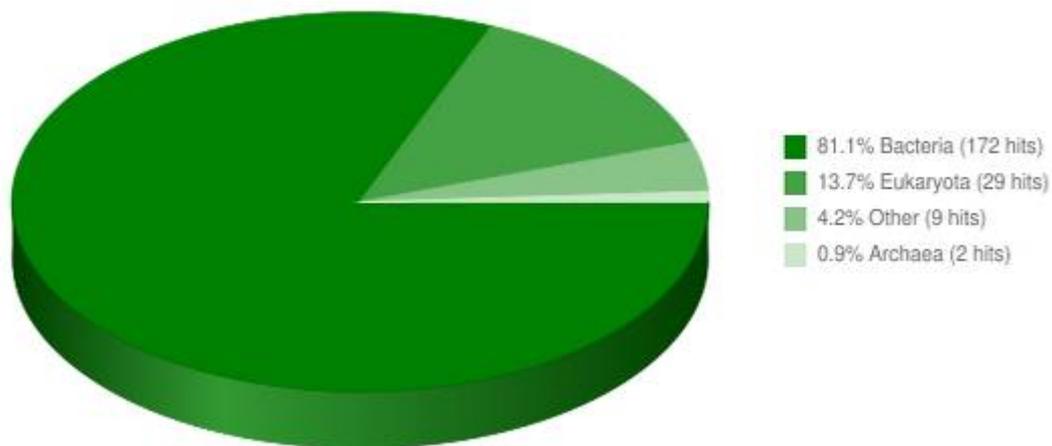


Figure A-27 : répartition des amidohydrolases entre les différents *phyla* bactériens (Protein Data Bank : <http://www.pdb.org>).

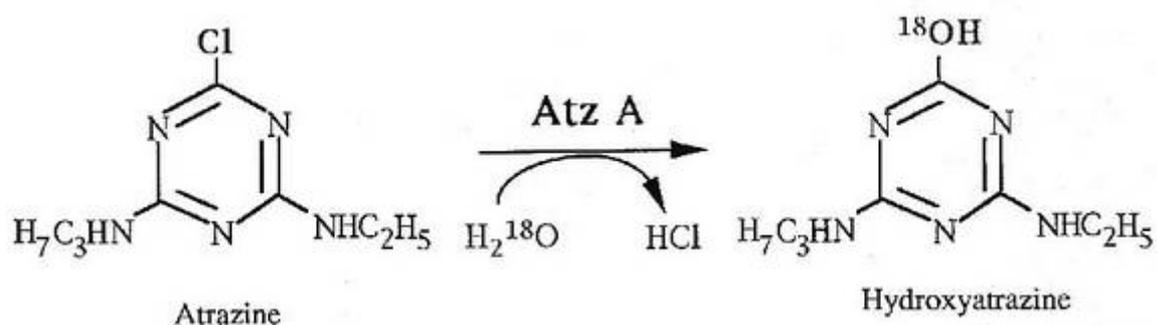


Figure A-28 : première étape de la dégradation de l'atrazine catalysée par AtzA. Cette déhalogénéation est le fruit de l'hydrolyse de la liaison C-Cl par une déhalogénase (De Souza *et al.*, 1996).

Le motif TIM est caractéristique des amidohydrolases. Il possède une fonction double : il (i) active la liaison à cliver et (ii) modifie la valence de la molécule d'eau, préambule nécessaire pour réaliser l'attaque nucléophile (Seibert and Raushel, 2005).

Ainsi, le motif TIM, constitué de 4 histidines et 1 résidu acide aspartique, impliqués dans la fixation du métal et dans l'activité catalytique, est fréquemment retrouvé dans les séquences amino-acidiques des enzymes appartenant à la super-famille des amidohydrolases (Kim and Kim, 1998). Les amidohydrolases sont représentées dans l'ensemble des domaines du vivant : *Eubacteria*, *Archea*, *Eucarya* (PDB) (Figure A-27).

Ces enzymes constituent un modèle enzymatique très étudié. Ainsi, jusqu'à présent, 149 amidohydrolases ont été cristallisées et leur structure quaternaire analysée par cristallographie aux rayons X (Proteine Data Bank : <http://www.pdb.org>). L'analyse cristallographique a permis de définir 7 sous-groupes sur la base de variations structurales du centre métallique divalent, du mode de fixation du métal dans le tonneau TIM et du type de métal fixé.

## **2. Les 6 enzymes de la voie atz de dégradation bactérienne de l'atrazine.**

La voie *atz* de dégradation de l'atrazine comprend 6 enzymes appartenant à la super-famille des amidohydrolases. La voie haute transformant l'atrazine en acide cyanurique consiste en 3 hydrolyses catalysées par (i) l'atrazine chlorohydrolase (AtzA), (ii) l'hydroxyatrazine ethylaminohydrolase (AtzB) et (iii) la N-isopropyl-ammélide N-isopropylaminohydrolase (AtzC). L'intermédiaire métabolique issu de la voie haute est pris en charge par la voie basse constituée de l'acide cyanurique amidohydrolase (AtzD), la biuret hydrolase (AtzE) et l'allophanate hydrolase (AtzF).

### **2.1 AtzA (Atrazine Chlorohydrolase) (EC 3.8.1.8)**

La première réaction enzymatique de la voie haute est une déhalogénéation qui initie le processus de dégradation de l'atrazine. Elle consiste en une hydrolyse de la liaison associant le chlore à l'hétérocycle et est à l'origine de la substitution du chlore en C2 par un résidu hydroxyle (De Souza *et al.*, 1996) (Figure A-28) conduisant à la production d'un métabolite : l'hydroxyatrazine.

Cette réaction est catalysée par l'atrazine chlorohydrolase (AtzA) (EC 3.8.1.8), homotétramère ou homopentamère de 209 à 245 kDa composé de 4 à 5 sous-unités de 52,4 kDa (De Souza *et al.*, 1996). Cette famille, regroupe surtout des enzymes catalysant la rupture de la liaison amide ainsi que la substitution du groupement amine de l'hétérocycle (Seffernick *et al.*, 2002). Ainsi, si la déchlorination ne constitue pas la principale activité catalytique de cette super-famille, certaines

**Tableau A-IV : composition en acides aminés d'AtzA (De Souza *et al.*, 1996).**

Résidu	Nombres de résidus amino-acyls	
	Prédis de la séquence	Déterminé par hydrolyse protéique
A = Ala	53	50
B = Asx	47 <sup>a</sup>	46 <sup>a</sup>
C = Cys	4	4
F = Phe	11	15
G = Gly	35	46
H = His	20	18
I = Ile	25	26
K = Lys	9	16
L = Leu	36	39
M = Met	21	18
P = Pro	18	22
R = Arg	39	35
S = Ser	23	23
T = Thr	21	26
V = Val	48	46
W = Trp	6	ND <sup>b</sup>
Y = Tyr	14	17
Z = Glx	43 <sup>c</sup>	47 <sup>c</sup>

\* a : mélange d'Asp et Asn

b : non déterminé par cette méthode

c : mélange de Glu et Gln

peuvent être polyvalentes et ont été caractérisées comme étant capables d'hydrolyser les liaisons C-Cl tout comme les liaisons C-N.

L'adénosine désaminase est par exemple capable de catalyser l'hydrolyse de la liaison C-Cl (Bär and Drummond, 1966). L'efficacité de la déhalogénéation est toutefois 10 fois inférieure à l'activité de désamination.

Le gène codant cette protéine compte 1419 paires de bases (pb) soit 473 résidus amino-acides (Tableau A-IV). Il présente les séquences consensus caractéristiques de la famille des amidohydrolases décrites par Holm et Sander en 1997.

L'analyse génétique a montré un pourcentage d'identité de 47% avec TrzA, une enzyme identifiée chez *R. corallinus* NRRL B-15444R catalysant également la déchlorination des *s*-triazines. Contrairement à AtzA catalysant spécifiquement la déhalogénéation de l'atrazine (Seffernick *et al.*, 2002), TrzA est également capable de catalyser des réactions de désamination de l'hétérocycle (Mulbry, 1994). Ainsi, il semble que les affinités d'AtzA et de TrzA diffèrent selon le degré de substitution de l'hétérocycle. Cette dernière présente une affinité plus forte pour les *s*-triazines monoalkylées plutôt que dialkylées (Mulbry, 1994).

L'atrazine chlorohydrolase présente la particularité d'interagir avec un ion métallique (Seffernick *et al.*, 2002), à l'inverse d'autres enzymes impliquées dans la déhalogénéation hydrolytique telles que l'aloalkane déhalogénase (Verschueren *et al.*, 1993) ou la 4-chlorobenzoil CoA déhalogénase (Benning *et al.*, 1996) qui ne peuvent être qualifiées de métalloenzymes. Le métal, en l'occurrence le Fe(II), est coordonné au niveau du site catalysant la déchlorination. AtzA est également susceptible d'interagir avec Mn(II) et Co(II) afin de catalyser la déchlorination de l'atrazine (Seffernick *et al.*, 2002). AtzA possède un centre métallique de type mononucléaire qui fixe un ion métallique par sous-unité.

Sur la base de l'homologie de la région de fixation du métal HxH, AtzA a été proposée comme un membre de la famille des amidohydrolases (Seffernick *et al.*, 2002). Le motif HxH consistant en deux résidus histidine séparés d'un amino-acyle est situé à l'extrémité du premier brin  $\beta$ . Dans le cas de la super-famille des amidohydrolases métallo-dépendantes, le centre de fixation du métal est caractérisé par ce motif HxH ainsi que par deux autres histidines respectivement placées sur les extrémités des brins  $\beta 5$  et  $\beta 6$  et un résidu acide aspartique en  $\beta 8$  (Li *et al.*, 2006). Tout comme la cytosine désaminase (Ireton *et al.*, 2002), l'atrazine chlorohydrolase utilise préférentiellement le Fe(II) comme métal catalytique. Cela constitue un trait biochimique caractéristique d'AtzA puisque la plupart des autres amidohydrolases, et plus généralement l'ensemble des enzymes,



utilisent d'autres métaux ligands (Seffernick *et al.*, 2002). Les résidus His66, His68, His243, His276 et Asp327 constituent le centre de fixation du métal d'AtzA (Scott *et al.*, 2009). Ce site est similaire à celui de la  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdéhyde décarboxylase où le métal fixé est le Zinc (Martynowski *et al.*, 2006). Il est complexe de définir le caractère mono- ou dinucléaire du centre de fixation métallique de l'enzyme. En effet, étant donnée l'homologie de la structure entre deux sites de fixation métallique, la seule analyse de séquence ne suffit pas à les discriminer. En revanche d'un point de vue structural, les enzymes présentant la capacité à fixer deux ions métalliques sont caractérisées par la présence d'un résidu lysine carbamylé (modification post-traductionnelle consistant en une réaction associant  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ) agissant comme un ligand entre les deux ions fixés sur les deux sites respectifs (Benning *et al.*, 1995). Ainsi, la carbamylation de la lysine constitue un facteur préalable à la fixation du métal sur l'apoenzyme. En effet, la fonction carbamate étant thermodynamiquement défavorable, elle n'est stabilisée que par la fixation de l'ion métallique (Shim and Raushel, 2000). Ainsi, les différences entre une enzyme à site de fixation binucléaire et une enzyme à site de fixation mononucléaire sont la présence de la lysine carbamylée et le rôle que tient la quatrième lysine (servant à lier le second métal).

*Nb : Cette lysine est conservée chez l'enzyme mononucléaire mais sert à lier l'hydrogène au lieu du métal.*

Les relations stœchiométriques entre le ligand et l'ion métallique chez AtzA ainsi que l'absence de carbamylation, ont permis de montrer le caractère mononucléaire du site de fixation du cation (Seffernick *et al.*, 2002). Le site de fixation du substrat d'AtzA est composé de la Glu246, l'Asn328 et la Ser331. Ils sont impliqués dans la coordination du substrat dont l'importance du positionnement pour la catalyse a été vérifiée par mutagenèse (Raillard *et al.*, 2001). La Phe84, le Trp87 et la Leu88 forment un complexe hydrophobe au sein du site actif et sont impliqués dans les interactions  $\pi$ - $\pi$ .

*Le mécanisme catalytique.*

Selon un modèle comparatif avec la cytosine désaminase de *Saccharomyces cerevisiae*, la catalyse s'effectuerait selon cette chronologie : l'atrazine est fixée à l'enzyme *via* une interaction interatomique aboutissant à l'empilement des orbitales  $\pi$  appartenant à l'hétérocycle aromatique du substrat et celle de la cavité hydrophobe formée par la Phe84, le Trp87 et la Leu88. De plus une association se forme entre le substrat et le Glu246 *via* une liaison hydrogène. La partie du site actif contenant le Fe(II) et l'Asp327 sont alors responsables de la formation d'un hydroxyde aux propriétés nucléophiles. L'attaque nucléophile sur le C4 qui en résulte conduit à la formation d'un



intermédiaire tétraédrique dont la stabilisation, consécutive au départ de l'atome de chlore, sera assurée par une interaction entre le chlore réduit et la Ser331 (dont l'électronégativité acquise est stabilisée par l'Asn328) (Scott *et al.*, 2009).

#### *L'évolution du gène *atzA* :*

Plusieurs hypothèses évolutives ont été imaginées pour expliquer l'apparition du gène *atzA*, l'une d'entre elles suppose une évolution par accumulation de mutations dans la séquence du gène *triA* (codant pour la mélamine désaminase) ayant abouti à la formation de l'atrazine chlorohydrolase sélectionnée en réponse à la pression de sélection résultant de l'utilisation généralisée d'atrazine. Seuls 9 acides aminés divergent entre ces deux enzymes. Cette divergence se manifeste notamment dans une substitution de l'Asn328 et la Ser331 (coordinateurs du substrat chez l'atrazine chlorohydrolase) par l'Asp328 et la Cys331 (Seffernick *et al.*, 2001) témoignant d'une transition évolutive somme toute assez simple entre ces deux enzymes. Une autre différence réside dans le fait que le résidu chlorure substitué à l'hétérocycle de l'atrazine par un hydroxyle présente une plus forte labilité que le résidu amine généré par l'hydrolyse catalysée par TriA.

#### 2.2 TrzN (Atrazine Chlorohydrolase) (EC 3.8.1.8)

Si les bactéries à Gram-négatifs synthétisent une atrazine chlorohydrolase codée par le gène *atzA*, les bactéries à Gram-positifs seront à même d'hydrolyser l'atrazine à l'aide d'une chlorohydrolase codée par le gène *trzN* (Shapir *et al.*, 2006). Or, bien que catalysant toutes deux la déhalogénéation de l'atrazine (Meyer *et al.*, 2009), elles peuvent être discriminées d'un point de vue (i) génétique mais aussi (ii) fonctionnel :

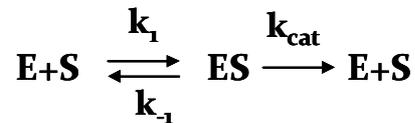
(i) en effet, la protéine TrzN d'*Arthrobacter aureescens* ne présentant que 26% d'identité avec la séquence en acides aminés d'AtzA; on peut donc présager qu'elles dérivent d'ancêtres phylogénétiquement distincts (Shapir *et al.*, 2007).

(ii) de plus, TrzN est capable de substituer non seulement les groupements halogènes de l'hétérocycle de l'atrazine, mais également les groupements cyano-, azido-, les halogène-, O-alkyles et *s*-alkyles ainsi que d'autres types de substituants (amétryne, méthylmercaptop). Ces possibilités lui assurent *a priori* un spectre de substrats plus large (Shapir *et al.*, 2005a) que celui d'AtzA limité à 2 composés : 2-chloro-4,6-N-monoalkyl- ou 2-chloro-4,6-N-dialkyl-2,3,5-triazine (Seffernick *et al.*, 2000). Ce plus grand spectre de substrat pourrait représenter un atout évolutif important pour TrzN comme le suggère les dernières études d'isolement et de caractérisation de souches dégradant l'atrazine qui montrent la prévalence du gène *trzN* (Arbeli et Fuentes, 2010).

$E+S \rightleftharpoons ES \xrightarrow{k_{cat}} E+S$

Les réactions enzymatiques répondent à l'équation suivante.

$k_{cat}$  est donc la constante de vitesse de la dissociation du complexe enzyme substrat et détermine la vitesse de la réaction enzymatique



Etant donné cette transformation bimodale le produit ne sera pas formé en même temps que le substrat sera dégradé. Il en résulte une variation de la vitesse en fonction de la concentration en substrat. On considère  $V_0$  la vitesse initiale de formation de complexe enzyme substrat (ES), lorsque la totalité des centres réactionnels sont saturés (associés à un substrat) on obtient  $V_{max}$  (valeur qui sera également conséquence de la quantité d'enzyme) et correspondra au nombre maximum de molécule de substrat transformé en produit par unité de temps.

Le  $K_M$ , en revanche est constant et propre à une réaction enzymatique puisqu'elle est définie par le rapport :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

Littéralement le  $K_M$  correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse a atteint la moitié de la vitesse maximale.

*La cinétique de la plupart des enzymes obéissent à cette loi mais il existe des exceptions*

Figure A-29 : définitions enzymologiques.



Figure A-30 : structure de l'enzyme TrzN où l'on peut apercevoir les structures secondaires ainsi que les deux ligands entourés de rouge (Seffernick *et al.*, 2010).

Cette sélection pourrait aussi être le fruit d'une différence d'activité catalytique puisque l'enzyme TrzN présente un  $k_{cat}/k_m$  (Figure A-29) supérieur à AtzA vis-à-vis de ses *s*-triazines (Seffernick *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2009).

D'abord caractérisée comme n'appartenant pas aux métalloenzymes, l'activité catalytique de TrzN a par la suite été montrée comme étant dépendante de la présence de zinc (Shapir *et al.*, 2005a). Tout comme AtzA, TrzN appartient donc à la super-famille des amidohydrolases métallodépendantes (Mulbry *et al.*, 2002) et fixe le Zinc au niveau d'un centre métallique à raison d'un atome par sous-unité protéique.

Si AtzA est capable de déhalogéner les *s*-triazines, les expériences tentées avec des pyrimidines se sont montrées infructueuses, mettant en évidence l'importance du nombre d'azote et leur position sur l'hétérocycle (Seffernick *et al.*, 2000). En effet, pour AtzA, cette réaction nécessite la présence d'un alkyle latéral en position *mé*ta pour permettre la déhalogénéation. En revanche TrzN requiert un ou plus d'un N-alkyle à cette même position pour catalyser la déhalogénéation (Topp *et al.*, 2000a).

La cristallisation (1,4 Å) de TrzN montre une structure dimérique. L'interface de ce dimère est formée d'une structure boucle-hélice *a* (408-432), d'une hélice *a* (348-363) et d'une boucle formée par les acides aminés compris dans l'intervalle (85-94). Les 54 acides aminés situés en position N-terminale forment deux feuillets  $\beta$  et sont situés à l'extérieur du tonneau ( $\beta a$ )<sub>8</sub> et localisés à l'arrière du « socle » du tonneau (Seffernick *et al.*, 2010) (Figure A-30).

Tout comme l'hydrolase à site de fixation mononucléaire, TrzN présente trois histidines ainsi qu'une quatrième interagissant avec la molécule d'eau ou un radical hydroxyle, mais est cependant dépourvue du résidu aspartate couramment impliqué dans la fixation de l'ion métallique. Chez TrzN, la thréonine (Thr) est en position 325 en remplacement de l'aspartate. Cette substitution est responsable de la création d'une distance trop éloignée du métal (3,3 Å) et constitue ainsi un mauvais candidat pour sa fixation. TrzN a un site de fixation métallique différent des autres amidohydrolases ; ainsi le métal qui est habituellement coordonné par 5 éléments, ne sera dans ce cas que lié à 4 atomes. Il est probable que la thréonine soit impliquée dans le positionnement de la molécule d'eau pour l'attaque nucléophile.

Si la structure protéique de TrzN la classe sans nul doute dans la super-famille des amidohydrolases, il persiste néanmoins des différences témoignant de la singularité de cette enzyme car, à l'inverse des autres amidohydrolases, elle utilise le Zinc dans son site actif. Dans ce cas, cet ion métallique n'est lié que par trois histidines et par l'eau ou l'hydroxyde.

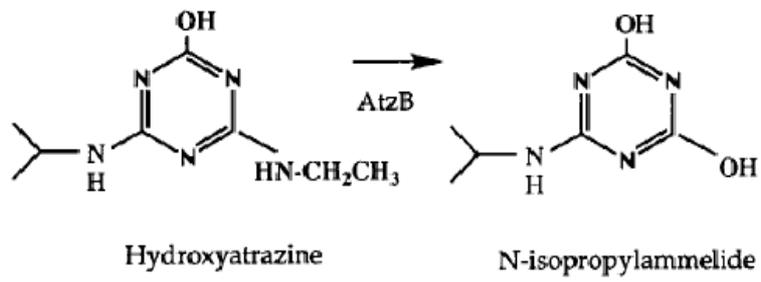


Figure A-31 : seconde étape de la dégradation de l'atrazine catalysée par AtzB (Boundy-Mills *et al.*, 1997).

Afin de comprendre l'origine évolutive de TrzN, une hypothèse reposant sur sa similarité structurale avec l'anhydrase carbonique, une métalloprotéine utilisant également le Zinc au sein de son site actif, a été formulée. Brièvement, l'His274 interagirait avec la liaison Eau-Zinc, et conduirait à la protonation de l'hétérocycle facilitant par la suite sa substitution nucléophile. Cette protonation serait à l'origine d'une amélioration de l'activité catalytique avec les substrats *p*-méthyle et *O*-méthyle. Cependant, la protonation du cycle aromatique n'est pas nécessaire pour les réactions de déhalogénéation (Seffernick *et al.*, 2010).

Dans les souches isolées de sols agricoles régulièrement traités à l'atrazine, le gène *trzN* est souvent associé aux gènes *atzB* et *atzC* (Sajjaphan *et al.*, 2004). Cette composition mixte de la voie haute de l'atrazine a été identifiée pour la première fois chez *Nocardioides* sp. SP12 (Piutti *et al.*, 2003) puis retrouvée dans d'autres souches telles que *Arthrobacter aureescens* TC1 (Sajjaphan *et al.*, 2004) ou des *consortia* dégradants (Udikovic-Kolic *et al.* 2008, 2010). Récemment, une étude phylogéographique menée en Amérique du Sud a suggéré la prévalence de la combinaison *trzN*, *atzBC* au sein de différents isolats bactériens minéralisant l'atrazine (Arbeli and Fuentes, 2010).

L'ensemble de ces observations constitue un faisceau convergent révélant une plus grande représentation de *trzN* par rapport à *atzA*. Si on omet le caractère stochastique de cette distribution, on pourrait suggérer que ce phénomène soit la conséquence d'une sélection positive de ce gène en raison des capacités catalytiques et du plus grand panel de substrats reconnus par la protéine qu'il code. Toutefois, la mobilité de ce gène, *via* son recrutement par des éléments d'insertion, lui conférant un caractère de transférabilité pourrait également constituer une piste expliquant son ubiquité.

### 2.3 L'Hydroxyatrazine N-éthylaminohydrolase (AtzB) [EC 3.5.99.3]

AtzB la seconde enzyme impliquée dans la dégradation de l'atrazine catalyse l'hydrolyse de la chaîne latérale N-éthylamine (N-déalkylation) de l'hydroxyatrazine [2-hydroxy-4-(éthylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine] et elle aboutit à la formation d'un composé non phytotoxique : le N-isopropyl-ammélide (Boundy-Mills *et al.*, 1997) (Figure A-31). Contrairement à AtzA, AtzB est répartie aussi bien chez les bactéries à Gram-positifs que chez les bactéries à Gram-négatifs. AtzB catalyse non seulement la désamination de l'hydroxyatrazine, mais aussi la déhalogénéation de l'atrazine (Seffernick *et al.*, 2002).

Mais AtzB présente une activité catalytique ( $k_m$ ) plus élevée pour la réaction de désamination que pour la déchlorination. Tout comme les autres enzymes appartenant à la super-famille des amidohydrolases, AtzB conserve l'organisation  $(\beta\alpha)_8$  capable de lier également un seul ion

Chaines latérales  
préférentiellement  
hydrolysées

Efficacité (%)

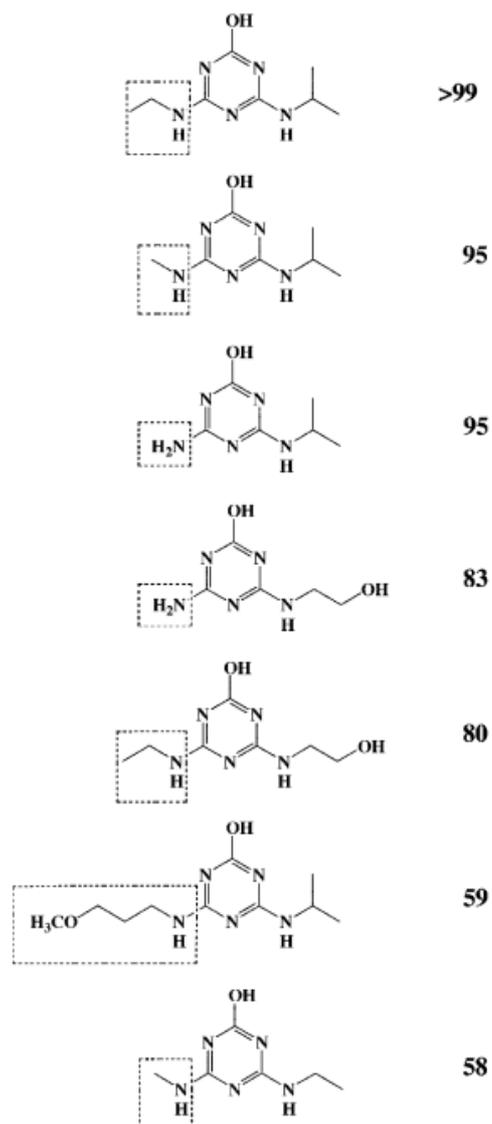


Figure A-32 : groupes alkyles des triazines asymétriques (encadrés sur les molécules) préférentiellement hydrolysés par AtzB (Seffernick *et al.*, 2007).

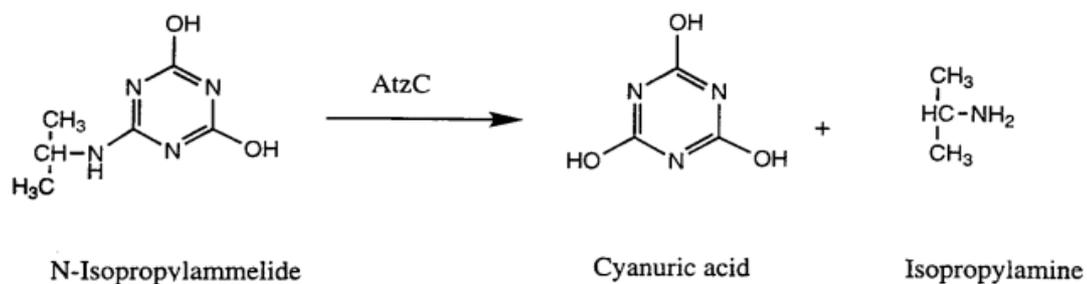


Figure A-33 : réaction catalysée par AtzC (Sadowsky *et al.*, 1998).

métallique. Assimilés à la structure d'AtzA, on retrouve les 4 histidines et l'acide aspartique impliqués dans la liaison de l'ion métallique mais à des positions différentes His74, His76, His245, His280 et Asp331 ainsi qu'un résidu glutamate localisé 3 acides aminés en amont de la première histidine, permettant la stabilisation de l'hétérocycle lors de son ouverture. Ce résidu glutamate est ainsi positionné en 248 chez AtzA et en 241 chez trzN (Seffernick *et al.*, 2007).

AtzB requiert une orientation tridimensionnelle précise pour parfaire son activité. Ainsi, la présence du radical hydroxyle en C2 permettra une organisation optimale dans l'espace de la réaction. La seconde position sur le C4, correspondant à la liaison à hydrolyser, doit être une amine primaire, secondaire, tertiaire ou un chlorure et la position C6 devra être occupée par une amine primaire ou secondaire (mais pas tertiaire ni un autre groupe alkyle). Ainsi, ces trois positions requièrent un atome d'azote avec au minimum un proton pour la désamination (Figure A-32).

La réaction catalysée par AtzB requiert quatre éléments :

- i) la reconnaissance du radical hydroxyle en C<sub>2</sub> pour orienter la molécule ;
- ii) la présence d'un proton sur le groupe restant (l'isopropylamine) ;
- iii) le transfert d'un proton du Glu48 à l'azote du cycle adjacent au carbone portant le groupement partant, afin de stabiliser la structure transitoire tétraédrique ;
- iv) un donneur de proton potentiel au niveau du site actif enzymatique pour permettre le départ du groupement éthylamine.

Pour conclure sur l'importance catabolique d'AtzB, des études menées sur l'évolution des concentrations des différents métabolites de la minéralisation de l'atrazine ont montré une accumulation transitoire d'hydroxyatrazine, laissant présager le caractère limitant de la transformation de l'hydroxyatrazine catalysée par AtzB (Mandelbaum *et al.*, 1995; Assaf and Turco, 1994). Cette hypothèse a aussi été émise par Devers *et al.* (2008) à l'issue d'une expérience d'écologie évolutive rapportant le gain de fitness d'une souche nouvellement évoluée en raison de la duplication du gène *atzB* levant le caractère limitant de la transformation de l'hydroxyatrazine.

#### 2.4 N-isopropyl-ammélide N-isopropylaminohydrolase (AtzC) [EC 3.5.99.4]

La troisième réaction de la voie haute est catalysée par AtzC qui transforme le N-isopropylammélide en acide cyanurique (Figure A-33). AtzC appartient à la même super-famille qu'AtzA et B. Bien que l'identité générale soit faible, certains acides aminés clés sont communs,

**A**

Bs	PyrC	44	I	D	A	K	G	L	L	V	S	P	G	F	V	D	L	H	V	H	61
Ps	AtzC	45	I	D	A	K	G	N	L	V	S	P	G	F	V	D	A	H	T	H	62
Ps	AtzA	51	I	D	A	R	G	K	V	V	L	P	G	F	I	N	A	H	T	H	68
Ps	AtzB	59	V	N	C	R	G	L	T	A	Y	P	G	L	I	N	T	H	H	H	76
Ec	AdeC	75	I	D	A	R	G	A	T	A	V	P	G	F	I	D	A	H	L	H	92
Ax	Dan	53	I	D	A	R	G	L	A	L	A	P	G	F	I	D	S	H	T	H	70

**B**

Ps	AtzC	342	M	I	T	S	E	G	A	R	V	L	351...360	E	V	G	K	K	A	D	L	V	L	369
Ps	AtzA	366	M	A	T	I	D	G	A	R	S	L	375...385	E	T	G	K	R	A	D	L	I	L	394
Ps	AtzB	372	M	A	T	Q	G	G	A	D	C	L	381...390	A	V	G	R	A	A	D	F	F	A	399

Figure A-34: pourcentage d'identité d'AtzC avec d'autres enzymes appartenant à la famille des amidohydrolases (A) et d'autres protéines dégradant l'atrazine (B) (Sadovsky *et al.*, 1998).

Tableau A-V : pourcentage d'identité des gènes de la voie haute de différentes souches dégradant l'atrazine par rapport à ceux de *Pseudomonas* sp. ADP (De Souza *et al.*, 1998).

Strain	% DNA sequence identity <sup>a</sup>		
	<i>atzA</i>	<i>atzB</i>	<i>atzC</i>
<i>Pseudomonas</i> ADP	100	100	100
<i>Alcaligenes</i> SG1	99.2	100	100
<i>Ralstonia</i> M91-3	99.0	100	100
<i>Agrobacterium</i> J14a	99.1	100	100
Isolate 38/38	99.3	100	99.8

avec la cytosine désaminase (Figure A-34) (Sadowsky *et al.*, 1998). La cytosine désaminase présente un site actif capable de lier le Zinc, le Manganèse, le Cobalt et le Fer ; le  $K_m$  maximal étant observé avec l'ion fer (Porter and Austin, 1993), la conservation des résidus amino-acyles clefs entre ces deux protéines suggérerait un fonctionnement identique.

AtzC est capable de catalyser la rupture de la liaison C-N et peut ainsi séparer du cycle les chaînes latérales *N*-éthyle, *N*-butyle tertiaire et *N*-cyclopropyle ainsi que d'autres *N*-alkyles (Shapir *et al.*, 2002). Elle est en revanche incapable d'effectuer une catalyse similaire sur les ammélines (hétérocycles présentant deux chaînes latérales *N*-alkyles).

Shapir *et al.* ont montré en 2002 que les résidus clefs identifiés chez AtzA et AtzB tels que l'His60, l'His62, l'His217, l'His249 et l'Asp303 étaient retrouvés chez AtzC. Les études ont également montré que le métal requis pour cette catalyse était présent à raison de 0,5 mol de Zn par mol de sous-unité. Sur la base de cette observation, il a été proposé qu'AtzC soit un homotétramère doté d'un site actif de type mononucléaire fixant le Zinc.

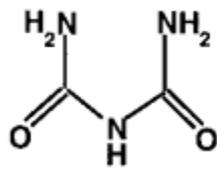
Les données cristallographiques (Protein DataBase) montrent un site de fixation de l'ion métallique (Zinc) constitué par l'His60, l'His62, l'His217 et l'Asp303, l'His249 formant une liaison hydrogène avec la molécule d'eau. AtzC présente une version simplifiée de la signature N-terminal dihydro-orotase, enzyme convertissant l'acide carbamoyl-aspartique en acide 4,5-dihydro-orotique (Sadowsky *et al.*, 1998).

Les trois gènes de la voie haute présentent des identités nucléotidiques fortes entre les souches suggérant une évolution récente (Tableau V).

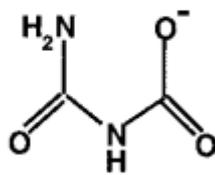
## 2.5 L'opéron Atz D, E et F

L'acide cyanurique (*s*-triazine-2,4,6-triol) est un polyamide cyclique pouvant exister sous forme tautomère cétonée (*s*-triazine-2,4,6-trione) et dont l'ouverture du cycle *s*-triazine est catalysée par hydrolyse d'une liaison C-N entraînant la formation de CO<sub>2</sub> (Eaton and Karns, 1991). Ce type d'hydrolyse, existant également pour le biuret (2-imidodicarbonyl diamide) et l'urée, a pour conséquence la respiration des carbones du cycle *s*-triazine en raison de leur haut degré d'oxydation (Mandelbaum *et al.*, 1995).

La transformation de l'acide cyanurique en composés simples est le fruit de l'action consécutive d'AtzD, AtzE et AtzF codées par l'opéron *atzDEF* décrit sur le plasmide pADP1 de *Pseudomonas* sp. ADP (Martinez *et al.*, 2001). Contrairement aux trois premiers gènes dont l'expression est constitutive, l'expression des gènes *atzDEF* est régulée transcriptionnellement par



**Biuret**



**Allophanate**

Figure A-35 : réaction catalysée par AtzE conduisant à la transformation du biuret en allophanate (Shapir *et al.*, 2002).

*atzR*, un régulateur transcriptionnel de type *lysR* (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005). De plus, contrairement à la voie haute spécifique de la dégradation de l'atrazine, la voie basse responsable de la dégradation de l'acide cyanurique est retrouvée chez de nombreuses bactéries (Cook *et al.*, 1985) et champignons (Jensen and Abdel-Ghaffer, 1969).

#### 2.5.1 AtzD (EC 3.5.2.15)

Cette enzyme partage la fonctionnalité d'ouverture de l'hétérocycle avec TrzD (chez *Pseudomonas* sp. NRRLB-12227 et *Klebsiella pneumoniae* entre autres), une autre enzyme catalysant l'hydrolyse de l'acide cyanurique. Bien que ces deux enzymes catalysent la même réaction, elles ne partagent que 56% d'identité. Comme évoqué précédemment pour TrzN et AtzA, pour lesquels une observation similaire a été réalisée, il est probable que ces deux enzymes dérivent d'ancêtres divergents (Fruchey *et al.*, 2003). On peut également supposer que ces enzymes soient plus anciennes que celles de la voie haute en raison de la présence d'acide cyanurique ou de molécules analogues dans l'environnement. Cette hypothèse est en conformité avec l'organisation en opéron régulé par un facteur de transcription caractéristique de fonction fixée dans le fond génétique des souches microbiennes.

L'activité d'AtzD est nulle avec de nombreux composés analogues de l'acide cyanurique (cytosine, thymine, uracile...). En revanche l'acide N-méthyle-isocyanurique constitue un très bon substrat puisqu'avec ce composé AtzD présente un  $K_m$  proche de celui observé pour l'acide cyanurique. Ces observations tendent à indiquer que le spectre de substrat d'AtzD est relativement étroit. AtzD présente un spectre de substrat restreint au malomanate et à l'allophanate et elle ne présente pas d'activité vis-à-vis des métabolites générés en amont du biuret (Shapir *et al.*, 2005b).

AtzD, bien qu'appartenant à la super-famille des amidohydrolases, ne présente qu'une faible identité avec AtzA, B et C laissant présager un temps de coalescence plus élevé depuis l'ancêtre commun (Wackett, 2004).

#### 2.5.2 AtzE (EC 3.5.1.84)

Cette enzyme est la seule à ne pas avoir été purifiée. En conséquence, les informations relatives aux aspects cinétique, thermodynamique et structural la concernant sont donc minces. Elle catalyse l'hydrolyse du biuret en allophanate libérant une molécule de  $CO_2$  et une de  $NH_3$  (Eaton and Karns, 1991) (Figure A-35). Elle appartient également à la famille des amidohydrolases. Il existe également une voie alternative transformant le biuret en urée et identifiée chez plusieurs souches bactériennes (Cook *et al.*, 1985).



### 2.5.3 AtzF (EC 3.5.1.54)

Cette allophanate hydrolase catalyse la dernière étape de minéralisation de l'atrazine en transformant 1 mole d'allophanate en 2 moles de CO<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub>. (Martinez *et al.*, 2001). Cette enzyme appartient à la super-famille des amidohydrolases et plus particulièrement au sous-groupe spécialisé dans les ruptures des liaisons C-N non comprises dans un cycle. Elle est également affiliée à la famille des amidases catalysant l'hydrolyse des amides et retrouvée dans un grand nombre d'espèces animales et végétales (Patricelli and Cravatt, 2000). Cette famille protéique est d'ailleurs caractérisée par la présence d'un motif riche en sérine et glycine (Ser-*cis*-Ser-Lys). Le résidu Ser165 serait impliqué dans l'attaque nucléophile de la partie carbonyle du substrat. Il jouerait le même rôle que la Ser131 de la malonamidase.

### 2.6 Bioénergétique et thermodynamique de la dégradation de l'atrazine

L'atrazine (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>Cl) comprend 8 atomes de carbone et 5 d'azote susceptibles de constituer une source de nutriment pour la cellule (C/N=1,6). Les trois C du cycle *s*-triazine présentant un état d'oxydation élevé, leur hydrolyse conduit à la formation de dioxyde de carbone (Radosevich *et al.*, 1995). Le CO<sub>2</sub> ainsi dissipé ne constitue pas une source de C. *A contrario*, les 5 atomes de C des chaînes latérales ne sont retrouvés qu'en faible pourcentage sous forme de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (Wolf et Martin, 1975) suggérant qu'ils puissent constituer un substrat carboné pour la cellule (Erickson and Lee, 1989). Dans ces conditions, l'atrazine semble principalement être une source d'azote. Néanmoins la souche *Delftia acidovorans* D24 est capable d'utiliser l'atrazine comme source de carbone et d'azote (Vargha *et al.*, 2005). Par ailleurs, Topp *et al.* (2000) suggèrent que *Nocardioides* sp. C190 est capable d'utiliser le carbone et l'azote de la chaîne isopropylamine. En revanche, *Pseudomonas* sp. ADP nécessitera un apport de carbone exogène (citrates à 1 g L<sup>-1</sup>) pour assurer sa croissance sur un milieu minéral comprenant l'atrazine comme seule source d'azote. L'hydrolyse séquentielle de la molécule d'acide cyanurique aboutit à la formation de 2 molécules de NH<sub>3</sub> lesquelles sont facilement utilisées par un grand nombre de bactéries pour leur biosynthèse (croissance, métabolisme). Les atomes d'azote et de carbone présents sur les chaînes pourront être utilisés par d'autres souches bactériennes (Smith and Crowley, 2006) ou par l'espèce qui les a générés. Ainsi, il semble que les carbones des chaînes alkyles sont incorporés dans la biomasse alors que ceux du cycle sont minéralisés (transformés en CO<sub>2</sub>) (Monard, 2008). Toutefois, étant donné que la plupart des études visant à isoler et caractériser des souches microbiennes dégradant l'atrazine ont été conduites en utilisant l'atrazine principalement comme une source d'azote, il est probable que cela induise une distorsion dans les conclusions avancées à ce sujet. Pour répondre de façon catégorique à ces questions des analyses poussées de métabolomique et bioénergétique seraient nécessaires.

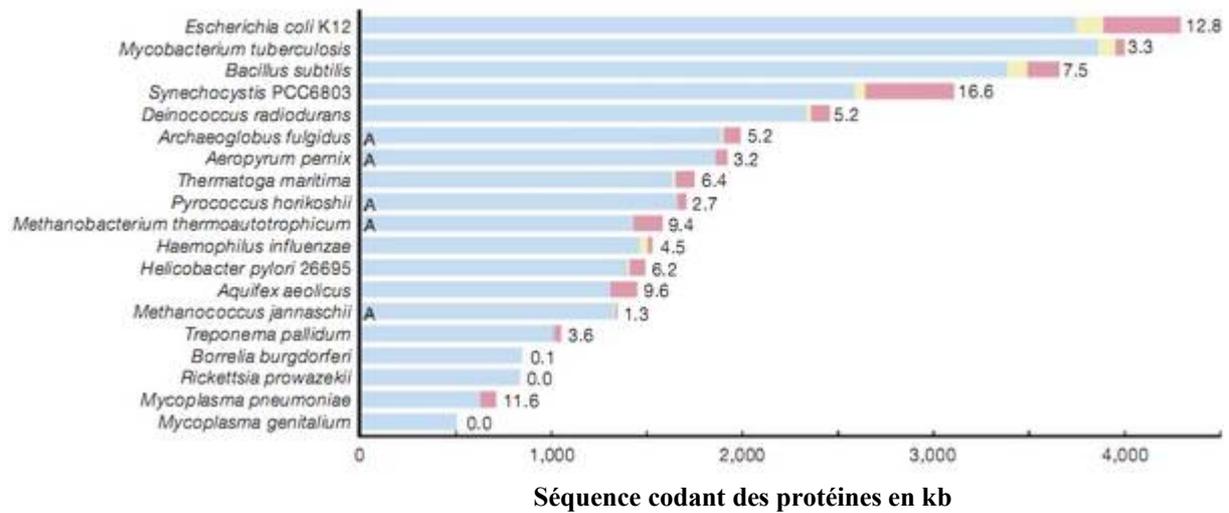


Figure A-36 : Distribution selon leur origine des différentes séquences codantes retrouvées au sein de différents organismes et notamment d'*Archaea* (A) ; ADN natif : bleu ; ADN issu d'éléments mobiles : jaune ; issus d'ADN étranger : rose (Ochman *et al.*, 2000).

## CHAPITRE III : LES MECANISMES GENETIQUES A L'ORIGINE DE L'ACQUISITION DES POTENTIALITES DE DEGRADATION CHEZ LES BACTERIES.

Les bactéries parviennent à coloniser la plupart des écosystèmes ce qui témoigne de leur grande capacité adaptative. Leur plasticité phénotypique et génotypique, résultant d'une longue évolution, leur permettent de s'adapter aux modifications de leurs environnements et de coloniser des niches écologiques présentant des caractéristiques physico-chimiques contrastées. Même si certaines variantes du phénotype peuvent être du simple fait de l'effet de l'environnement (donc exemptes de toutes modifications génétiques), celles qui seront fixées, donc transmissibles aux cellules filles, sont le fait de transfert horizontal de gènes et de variations individuelles de la structure génétique (Lawrence, 1997). Chez les procaryotes, les phénomènes de conjugaison, recombinaison, transduction, transformation et mutations sont responsables de l'évolution génétique (Arber, 1993).

### 3. Les transferts horizontaux

On définit le transfert horizontal de façon antithétique par rapport au transfert vertical que constitue la transmission de gènes *via* les processus mitotiques et méiotiques. Ainsi, des portions mono ou multi-géniques peuvent être transférées d'une cellule à l'autre et être à l'origine de modifications phénotypiques non silencieuses et transmissibles héréditairement (Griffith, 1928). Répondent à ce principe trois types de processus : i) la conjugaison, (ii) la transformation et (iii) la transduction. Ainsi, le développement de bactéries dégradant des molécules d'origine anthropique résulte de ce type de mécanismes permettant le recrutement et la fixation de gènes codant des enzymes de dégradation (van der Meer *et al.*, 1992; Davies, 1996). De la même façon, certaines bactéries ont assimilé des gènes de virulence et/ou de résistance aux antibiotiques à l'origine de la formation d'îlots de pathogénicité et/ou de résistance, respectivement (Hacker *et al.*, 1997). Le pourcentage de gènes acquis *via* des mécanismes de transferts horizontaux dépend des organismes et de leur sensibilité à ce type de transfert/acquisition (Ochman *et al.*, 2000) (Figure A-36). Toutefois, les programmes de séquençage massif de différents génomes microbiens montrent que pour certaines espèces jusqu'à 60% du génome ont été acquis par transfert horizontal. Ce type d'observation pose de nombreuses interrogations quant à la définition d'une espèce bactérienne et ouvre des perspectives intéressantes en termes de caractérisation de la fraction mobile des génomes microbiens.

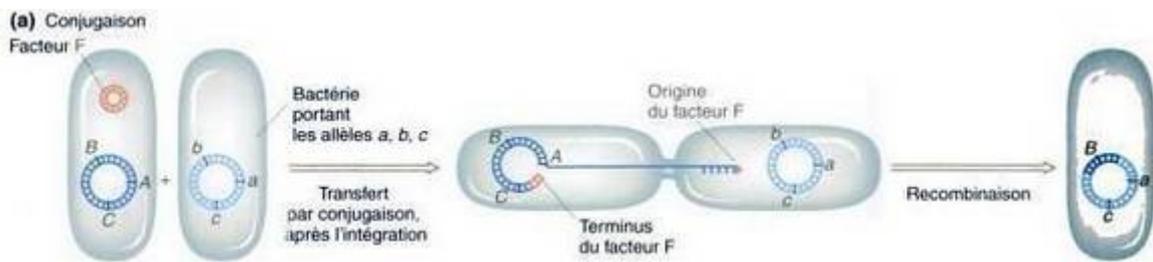


Figure A-37 : mécanisme général décrivant la conjugaison bactérienne (Griffiths *et al.*, 2000).

### 3.1 Le phénomène de conjugaison bactérienne

Le préambule de la caractérisation de la conjugaison bactérienne date du milieu du 20<sup>ème</sup> siècle où Lederberg a mis en évidence des échanges génétiques bactériens (Lederberg and Tatum, 1953). La conjugaison bactérienne est un processus d'échange unidirectionnel d'ADN faisant intervenir un contact spécifique entre deux cellules bactériennes (Lanka and Wilkins, 1995) (Figure A-37). Ce transfert s'effectue entre une souche donneuse (F+), c'est-à-dire porteuse d'un facteur de fertilité F (plasmide conjugatif) et celle qui en est exempte (F-) (Watson and Hayes, 1953). La conjugaison bactérienne permet l'échange de plasmide(s) conjugatif(s) dont les conséquences en termes de brassage génétique de la conjugaison, sont d'autant plus grandes que cette dernière peut avoir lieu entre deux espèces distinctes. Le transfert horizontal de plasmide conjugatif par ce phénomène est responsable de la majorité des transferts de gènes identifiés chez les bactéries ; il est souvent identifié comme les prémices de la sexualité chez les procaryotes.

#### 3.1.1 Mécanisme

Le pré-requis à la conjugaison bactérienne est la présence d'un plasmide conjugatif qui porte les gènes codant la machinerie répliquative (*ori*, origine de répllication et *oriT*, origine de transfert), les gènes codant les protéines structurales du pilus bactérien, ainsi que les éléments nécessaires à sa mobilisation (*par*, fonction de partition, *tra* et *trb*, gènes liés au transfert). Les plasmides conjugatifs de bactéries Gram-négatives ont été regroupés en 30 groupes d'incompatibilités (Neilson *et al.*, 1994). On dit de deux plasmides qui s'excluent mutuellement, c'est-à-dire qui ne peuvent coexister dans la même bactérie, qu'ils appartiennent au même groupe d'incompatibilité.

La première étape de la conjugaison bactérienne est la formation d'un pont cytoplasmique transmembranaire (système de sécrétion de type IV chez les bactéries à Gram-négatifs) entre la cellule donneuse et la cellule receveuse permettant l'échange du plasmide conjugatif (Christie, 2001). Le *pilus* bactérien est un homopolymère hélicoïdal de 15-20 kDa formé de polymères de piline (Marvin and Folkhard, 1986; Craig and Li, 2008). Le transfert plasmidique est alors initié au niveau d'*oriT*, une courte séquence d'ADN conservée constituant l'origine de transfert mais également le site d'achèvement de ce processus. La fusion du brin d'ADN va s'opérer à l'intérieur (site *nic*) de cette structure *via* la formation d'un complexe nucléoprotéique : le relaxosome (Llosa *et al.*, 2002). Une hélicase va modifier le degré d'hélicité de la zone *oriT* à l'origine d'une dénaturation locale et la relaxase (tyrosine transesterase) coupera l'un des deux brins. L'un des monomères restera alors fixé à une partie du complexe (Matson and Morton, 1991; Howard *et al.*, 1995) au niveau de la protéine de connexion (protéine caractérisée par une structure N-terminale formée d'hélices  $\alpha$  transmembranaires assurant son ancrage à la membrane interne et d'une partie

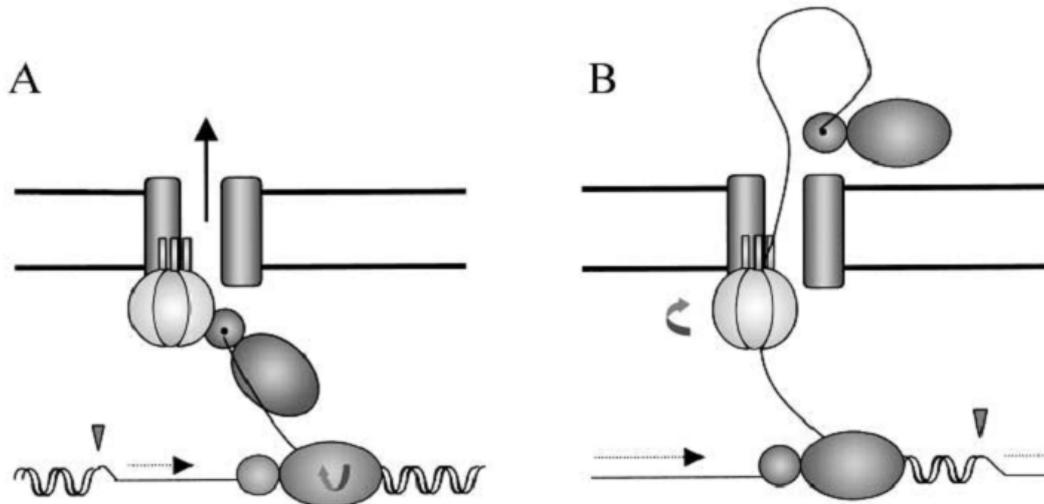


Figure A-38 : schéma représentant le transfert de l'ADN de la cellule donneuse à la cellule receveuse lors de la conjugaison bactérienne.

(A) La protéine transmembranaire (cylindre gris) est liée au premier complexe hélicase-relaxase par un hexamère protéique situé sur la membrane interne; le second complexe est lié à un des brins de l'ADN. (B) L'hexamère protéique pompe le brin lié au complexe hélicase-relaxase et le sépare du plasmide donneur (Llosa *et al.*, 2002).

C-terminale cytoplasmique (Lee *et al.*, 1999). Cette protéine assure la jonction entre le relaxosome et le système de sécrétion de type IV.

Ces protéines sont capables de fixer l'ADN sans nécessiter de séquence de reconnaissance (Figure A-38). La fusion de la totalité du plasmide sera alors assurée par la translocation de l'autre monomère de relaxase le long de la double-hélice afin de désolidariser le brin restant dans la cellule donneuse du brin transféré (ADNt) à la cellule receveuse. Pendant l'avancement de la fusion, l'extrémité 5' fixée au premier monomère d'hélicase se désolidarise des protéines de connexion et transitera dans le cytoplasme de la cellule voisine *via* le système de sécrétion de type IV. La protéine de connexion est en effet capable d'utiliser l'énergie sous forme de triphosphate afin de permettre le transport du complexe ADNt relaxase associé à l'action du système de sécrétion permettant l'expulsion du brin dans le cytoplasme adjacent. L'ADNt est recircularisé et répliqué afin de reconstituer le plasmide natif.

On considère trois types distincts de conjugaisons bactériennes (Davison, 1999) :

- (i) le transfert d'un plasmide conjugatif seul ;
- (ii) la transmission d'un plasmide non conjugatif par un plasmide conjugatif (Frey *et al.*, 1985) ;
- (iii) La co-intégration plasmidique.

### 3.1.2 Intérêt évolutif

Outre la résistance aux antibiotiques et l'acquisition de gènes de virulence, la conjugaison bactérienne est à l'origine de l'acquisition de gènes codant les enzymes impliquées dans les voies de dégradation de composés xénobiotiques. Ainsi, le plasmide pJP4 portant les gènes de dégradation de l'herbicide acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est transmissible à une fréquence comprise entre  $10^{-3}$  et  $10^{-6}$  (Neilson *et al.*, 1994).

Le plasmide pADP1 portant la voie de dégradation de l'atrazine est un plasmide conjugatif qui lors des expériences *in vitro*, est transmis avec des fréquences élevées. Par ailleurs, sa transmission par conjugaison bactérienne à la microflore tellurique a aussi été démontrée (Devers *et al.*, 2005).

### 3.2 La transduction

La transduction est le transfert d'un ADN bactérien partiel d'une cellule à une autre par l'intermédiaire d'un vecteur viral, le bactériophage. Bien que le spectre d'hôtes des bactériophages soit relativement étroit, en raison de contraintes physico-chimiques de la membrane bactérienne, la transduction de gènes par leur biais est importante (Nielsen *et al.*, 1998). En effet, du point de

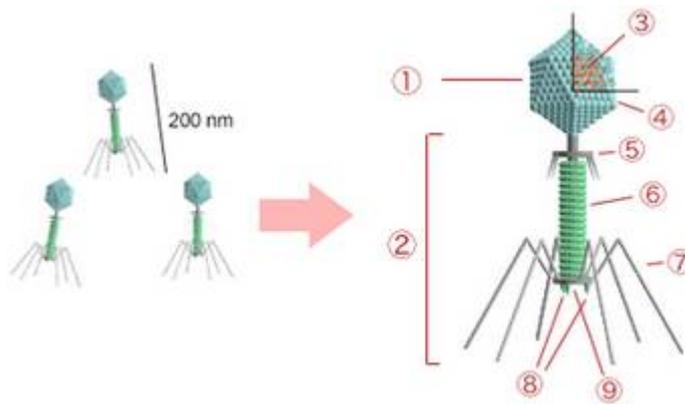


Figure A-39 : structure d'un bactériophage ; 1-Tête ; 2-Queue ; 3-Acide nucléique ; 4-Capside ; 5-Collier ; 6-Gaine hélicoïdale; 7-Fibre ; 8-Crochet de la queue 9-Plaquette basale hexagonale.

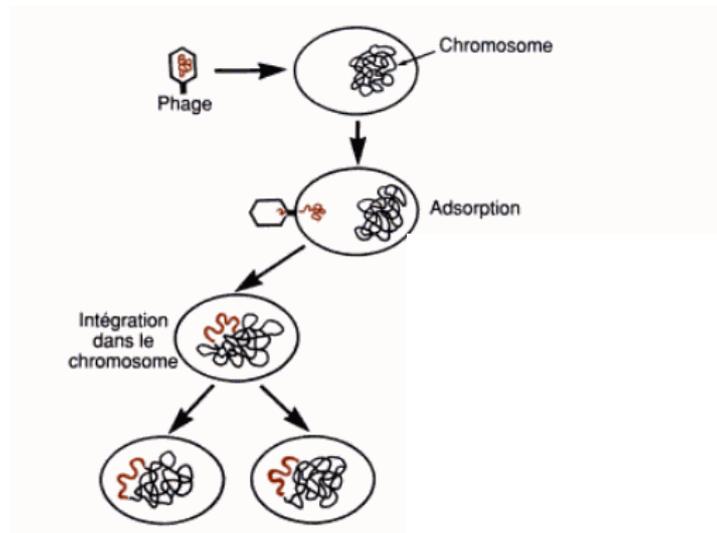


Figure A-40 : représentation schématique du cycle lysogénique d'un bactériophage (Schaechter *et al.*, 1999).

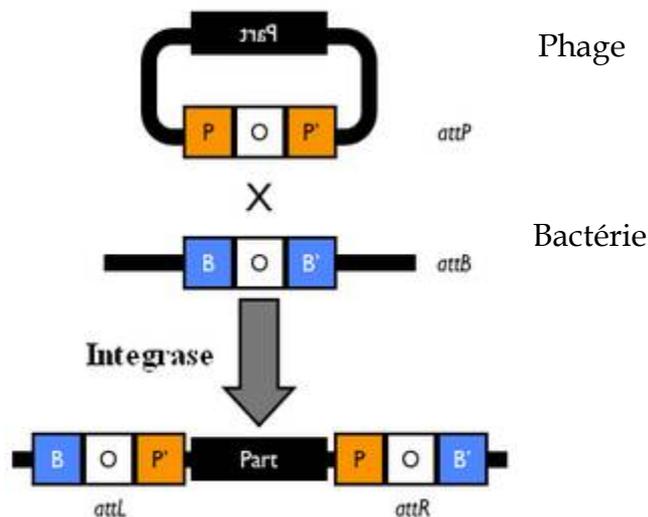


Figure A-41 : description schématique de l'insertion de l'ADN phagique dans l'ADN de la cellule hôte. Le site *attB* (B') bactérien se recombine avec le site *attP* (P') phagique. Cette réaction est catalysée par une intégrase. Le fragment (Part) sera donc transféré du phage à la bactérie (d'après Thorpe and Smith, 1998).

vue numérique, les bactériophages sont les structures vivantes les plus abondantes dans les sols (Marsh and Wellington, 1994).

### 3.2.1 Les bactériophages

Un bactériophage est un virus n'infectant que des bactéries (Figure A-39). Le classement systématique des virus demeure un sujet de controverses. L'absence d'organisation cellulaire et leur mode de reproduction, un cycle parasitaire obligatoire durant lequel ils mettent à profit la machinerie métabolique de leurs hôtes, sont des éléments qui les singularisent par rapport au reste du vivant. Les bactériophages sont constitués d'une capsidie protéique entourant une molécule d'ADN virale de taille comprise entre 5 à 650 Kb. L'analyse d'environ 1400 protéines capsidiques du bactériophage T4 a révélé sa diversité structurale (Comeau and Krisch, 2008). La capsidie est associée à une queue de structure polymorphe impliquée dans la fixation de la particule virale à l'hôte. L'ADN viral peut être de nature ribonucléique ou désoxyribonucléique. Au-delà de sa nature, il peut aussi différer par sa structure bicaténaire ou monocaténaire, les premiers représentants plus 95% des phages connus (Cohen, 1967).

Tout comme les virus eucaryotiques, les bactériophages sont tributaires de leur hôte pour accomplir leur cycle reproductif. On distingue les bactériophages accomplissant un cycle lysogénique et ceux réalisant un cycle lytique.

#### a) Cycle lysogénique

Après sa fixation à la cellule bactérienne hôte, le bactériophage inocule le prophage constitué de d'ADN viral, dans le cytoplasme bactérien car incapable seul d'assurer sa propre réplication. L'ADN viral s'intègre alors dans le chromosome bactérien (Figure A-40) *via* une recombinaison entre le site *attP* d'origine phagique et le site *attB* d'origine bactérienne. Cette réaction est catalysée par une intégrase (Figure A-41) (Groth and Calos, 2004).

Durant la phase lysogénique, l'ADN viral intégré dans le chromosome bactérien, répliqué durant la division bactérienne, est transmis verticalement aux cellules filles. Durant cette phase, les gènes viraux ne sont pas exprimés et n'affectent par conséquent pas l'hôte. Néanmoins, le fait de supporter la charge virale, qui peut représenter un fardeau génétique, est susceptible d'altérer la fitness de la population bactérienne. En tout état de cause, l'intégration de l'ADN viral est réversible et le prophage peut être excisé et entrer dans le cycle lytique.

#### b) Cycle lytique

Le cycle lytique aboutit à la lyse de la cellule hôte. Dans ce cas, suite à l'injection de l'ADN viral, la machinerie cellulaire est détournée pour assurer la prolifération de l'ADN et des protéines

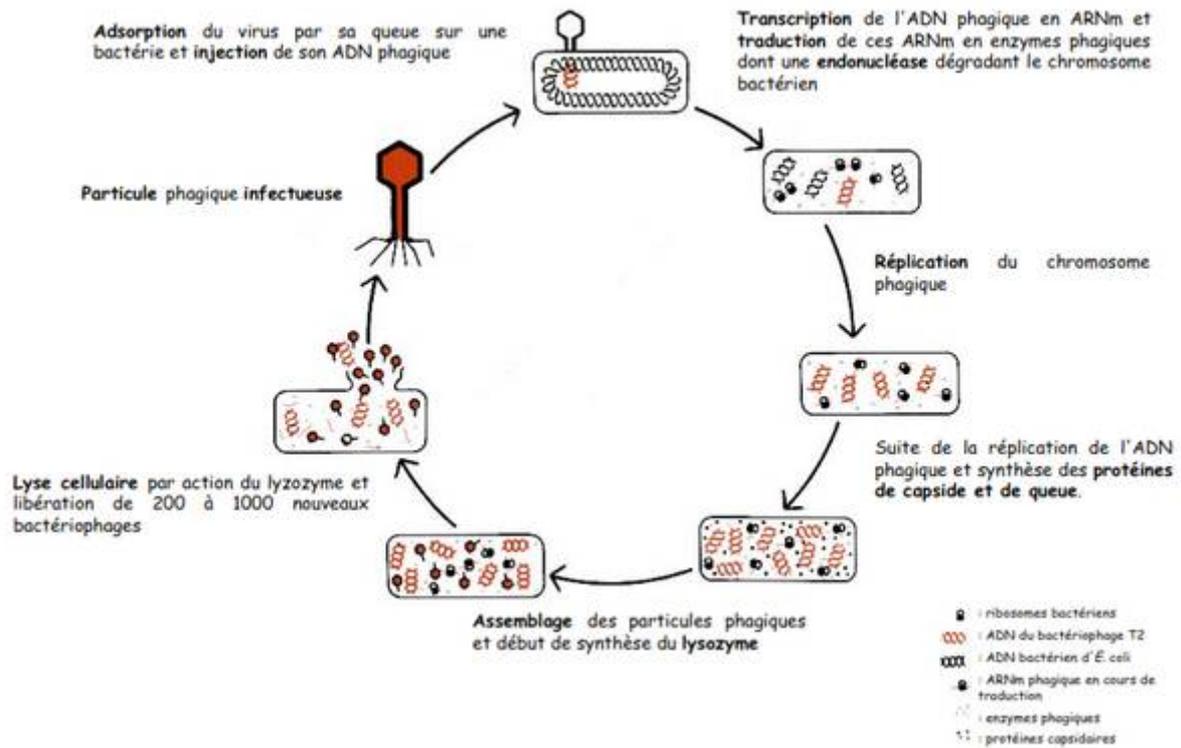


Figure A-42 : schéma représentant le cycle lytique d'un bactériophage (documents en ligne, Institut Pierre et Marie Curie).

virales. L'assemblage de ces constituants viraux va précéder leur expulsion par lyse cellulaire (Figure A-42).

### 3.2.2 La transduction comme moteur de l'évolution bactérienne

Etant capable de véhiculer et d'insérer des fragments d'acides nucléiques viraux dans le génome bactérien, les bactériophages jouent un rôle prépondérant dans l'histoire évolutive des bactéries (Boyd and Brüssow, 2002). Ce rôle a été démontré par une étude bioinformatique montrant que sur 82 génomes bactériens entièrement séquencés, 51 portaient des acides nucléiques d'origine phagique pouvant représenter jusqu'à 20% du génome (Casjens, 2003). Récemment, la prévalence de ce phénomène a même été rapportée pour le gène *trzN*, codant l'atrazine chlorohydrolase, dans les sols (Arbeli and Fuentes, 2010).

### 3.3 La transformation naturelle

La condition *sine qua non* à la réalisation de la transformation bactérienne réside dans l'état de compétence de la bactérie réceptrice, état transitoire ne conquérant qualitativement que certaines espèces bactériennes et quantitativement que certains membres de la population.

En effet, seules certaines espèces bactériennes sont sensibles à la transformation. L'état de transformation naturelle ne peut s'observer que chez un nombre limité d'espèces bactériennes à Gram-positifs comme *Streptococcus* et *Bacillus* ou à Gram-négatif comme *Neisseria*, *Branhamella*, *Acinetobacter*.

#### *L'Etat du cycle cellulaire*

Les systèmes de transformation naturelle rencontrés chez les bactéries à Gram-positif ou à Gram-négatif diffèrent de par les mécanismes de fixation et de transport de l'ADN exogène à travers l'enveloppe bactérienne. Au-delà, elles diffèrent aussi de par l'état de compétence qui sera acquis à différents moments du cycle de croissance. En effet, pour *Acinetobacter calcoaceticus*, cet état est atteint au début de la phase exponentielle (Palmen *et al.*, 1993) alors qu'il est atteint en fin de phase exponentielle pour *Bacillus subtilis* (Dubnau, 1991). D'autre part, au sein d'une même population, le pourcentage de cellules compétentes variera entre 1% et 10% selon l'espèce incriminée (Lorenz and Wackernagel, 1994).

### 3.3.1 Acquisition de l'état de compétence

Le phénomène de compétence, c'est-à-dire la faculté qu'a la cellule à incorporer puis fixer un fragment d'ADN, constitue la première étape de la transformation (Venema and Morris, 1979). Hormis des cas singuliers tels que *Neisseria gonorrhoeae*, chez qui la compétence est exprimée de



façon constitutive, les bactéries ne sont que transitoirement compétentes et ce en réponse à une induction d'origine génétique (Sparling, 1966). La transformation naturelle étudiée chez *Bacillus subtilis* fait état de l'implication d'environ 40 gènes, dont la moitié est concernée dans la mise en place de la compétence, les autres entrant en jeu dans l'incorporation génétique.

### 3.3.2 Production et excrétion du facteur de compétence

De nombreuses bactéries transformables sont capables d'acquérir leur compétence sous certaines conditions de croissance pouvant être liées par exemple à la qualité du milieu de culture. On distinguera l'acquisition d'une compétence naturelle de celle induite par choc thermique ou par électroporation.

L'excrétion de facteurs de compétences (CF), en général des polypeptides, est corrélée à la concentration cellulaire. Elle intervient notamment en fin de phase exponentielle, induisant l'état de la compétence. Les Csp (précurseurs des peptides de compétence) sont de petites protéines solubles de 5 à 10 kDa se fixant à des récepteurs cellulaires et constituant l'origine d'une cascade transductionnelle aboutissant à l'acquisition de l'état de compétence. Chez *Streptococcus pneumoniae* le CF est un peptide de 17 acides aminés codé par le gène *comC* (Havarstein *et al.*, 1995). Chez *Bacillus subtilis*, deux facteurs de compétence extracellulaires, dont la production est soumise à une régulation transcriptionnelle, sont tout d'abord requis. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de compétence de *Bacillus subtilis* sont identiques à ceux contrôlant la sporulation (Grossman, 1995).

Le premier facteur de compétence, ComX, considéré comme une phéromone est un peptide de 9 ou 10 acides aminés codé par un gène (*comX*) de 165 pb. Le précurseur sera clivé, ne laissant que les dix derniers acides aminés de la partie C-terminale constituant la portion active de la biomolécule, laquelle sera exportée vers le milieu extracellulaire (Solomon and Grossman, 1996).

### 3.3.3 Mécanisme général de la transformation

Chez *Bacillus subtilis*, la transformation requiert une série de protéines identifiées *via* l'étude de mutants non transformables et dont des analogues ont été identifiés chez d'autres bactéries à Gram-positif ou à Gram-négatif (Facijs and Meyer, 1993; Clifton *et al.*, 1994). Parmi ces protéines, nombreuses sont celles qui présentent une partie N-terminale hydrophobe apparentée à un système de sécrétion de type 2 (Dubnau, 1999). Ce sont des protéines membranaires impliquées dans la fixation de l'ADN libre extracellulaire de manière stable (Lorenz and Wackernagel, 1994). Notons que la nomenclature des gènes dont les produits sont impliqués dans

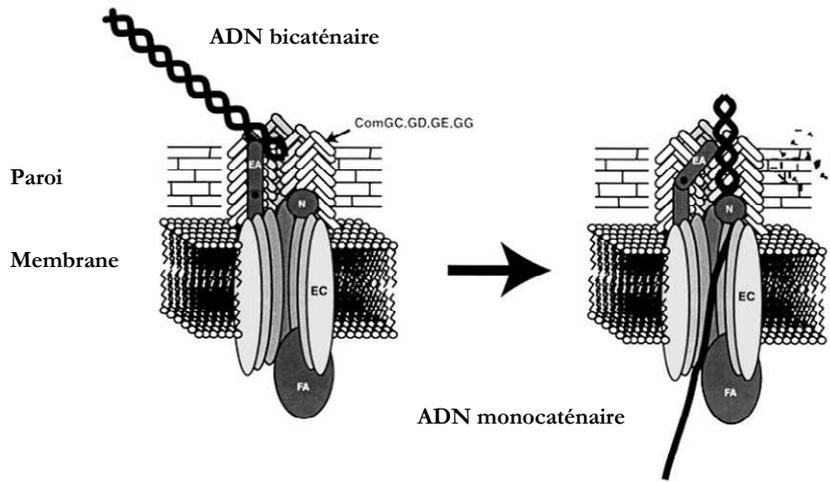


Figure A-43 : schéma du mécanisme externe de la transformation chez les bactéries à Gram-négatif (la nomenclature protéique est empruntée à *Bacillus subtilis*). L'ADN bicaténaire se fixe à la protéine réceptrice ComEA. La cassure du double brin est suivie par la libération d'une nucléase (N) qui va dégrader un des deux brins laissant de fait des acides nucléiques solubles dans le milieu. Le gène de la nucléase n'est pas identifié chez *B. subtilis*; chez *S. pneumoniae* il est nommé *endA*. Les protéines ComG sont connues comme formant une structure permettant l'accès de l'ADN jusqu'à ComEA à travers la paroi. Un des modèles propose qu'au contact de l'ADN, la protéine ComEA change de conformation afin de mettre en contact l'ADN et la nucléase. L'ADN monocaténaire ainsi formé se lie à la protéine transporteur ComFA et l'énergie engendrée par l'hydrolyse de l'ATP permettra le transport actif du brin à l'intérieur de la cellule. La protéine ComEC joue très probablement le rôle d'un pore membranaire (Dubnau, 1999).

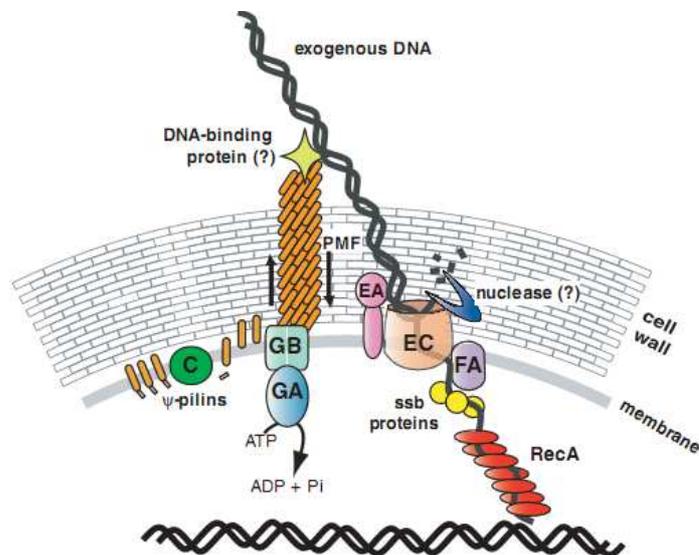


Figure A-44 : l'entrée de la molécule d'ADN chez *Bacillus subtilis*. La machinerie protéique est principalement située au niveau des pôles cellulaires. Les pré-pilines sont transformées par les peptidase puis transférées sur la face externe de la membrane. Elles y sont assemblées pour former le *pilus* lequel est chargé de faire transiter l'ADN. En effet, sous l'effet de la force protomotrice, le *pilus* va se rétracter mettant en contact l'ADN avec ComEA laquelle transportera l'ADN à travers la membrane plasmique à travers le canal ComEC. RecA va alors former un filament autour du simple brin et rechercher l'homologie avec la molécule d'ADN cible (Chen *et al.*, 2005).

la transformation est caractérisée par deux lettres : (i) la première étant celle de l'opéron auquel ils appartiennent et (ii) la seconde signifiant la position qu'ils occupent sur ce dernier.

#### a) Entrée de la molécule d'ADN

La première étape de la transformation est la fixation de l'ADN sur la membrane externe. Chez les bactéries à Gram-positif, la molécule d'ADN bicaténaire est ancrée au niveau de sites de fixation dont le nombre sera variable selon le type cellulaire (Figure A-43). Ainsi, environ 50 sites de fixation ont été catalogués chez *Bacillus subtilis* et de 33 à 75 ont été observés chez *S.pneunomiae*. Ainsi, ComGC, ComGD, ComGE et ComGG sont codés par un opéron (*comG*) et leur fonctionnement associé à une autre protéine ComC, protéase responsable du clivage de la prépiline IV (Chung and Dubnau, 1995). En plus des prépilines, l'opéron *comG* porte 3 autres gènes *comGF*, *comGA* et *comGB* dont les produits sont respectivement une petite protéine orthologue transmembranaire, une protéine fixant spécifiquement les acides nucléiques ainsi qu'une des protéines, analogue à celles présentes chez *Pseudomonas aeruginosa*, et impliquée dans l'édification du *pilus* de type IV (Nunn *et al.*, 1990). En effet à l'exception de ComGF, les protéines résultantes de l'expression des opérons *comG* et *comC* sont analogues à celles des bactéries à Gram-négatif et sont impliquées dans la sécrétion protéique à travers la membrane externe (Pugsley, 1993). Les membres de cette famille protéiques ont plus généralement été décrits comme étant indispensables à l'assemblage des *pili*, la sécrétion protéique ainsi qu'à l'acquisition de l'état de compétence. Il est d'ailleurs intéressant d'un point de vue évolutif que parmi les protéines impliquées dans différents systèmes (sécrétion, compétence, assemblage des *pilus*) nombreuses sont celles appartenant à la famille des protéines dites pré-pilines (Chung and Dubnau, 1998). Le premier gène situé sur l'opéron *comE* code pour une intégrase, qui, fixée à la membrane bactérienne, est capable de lier spécifiquement, au niveau de son extrémité C-terminale, les fragments d'ADN bicaténaires présents dans le milieu extracellulaire (Dubnau, 1999).

Le fragment d'ADN est alors transféré à un complexe de transfert d'ADN monocaténaire transmembranaire ATP-dépendant composé des protéines ComEC, ComEA et ComFA (Figure A-44).

#### b) Déroulement et internalisation du fragment

Le gène *comFA* code une protéine du type ATP-ase, responsable de l'internalisation de la molécule d'acide nucléique. Des études ont permis de localiser l'association préférentielle des protéines de transformation, notamment ComGA et ComFA, au niveau des pôles cellulaires (Hahn *et al.*, 2005). Notons qu'une protéine présentant une homologie avec une nucléase (EndA)



dont l'existence a été rapportée chez *S.pneumoniae*, serait chargée de la lyse du brin complémentaire et de fait, également associée au complexe.

Chez les bactéries à Gram-positif, la présence de la paroi nécessite l'intervention d'un autre système protéique pour permettre la transformation. Ainsi, un complexe formé par les protéines ComGC, ComGD, ComGE et ComGG permet l'accès de l'ADN au récepteur ComEA capable de modifier la porosité pariétale. Il est intéressant de noter que les protéines codées par l'opéron *comG* présentent une forte similarité avec celles impliquées dans la formation du *pilus* de type 4 et dans le système de sécrétion de type 2 chez les bactéries à Gram-négatif.

- ComGA appartient à la famille des ATP-ases de trafic dont le rôle est d'énergiser l'assemblage du *pseudopilus* ;
- ComGB est une protéine conservée présentant plusieurs sites d'attachement membranaire ;
- ComGF présente les caractéristiques d'une protéine membranaire intégrale ;
- ComGC, GD, GE et notamment ComGG sont similaires à des pilines de type 4 du système de sécrétion de type 2, car présentant des structures hydrophobes leur autorisant une association étroite avec les parties internes des membranes phospholipidiques.

Les protéines dites « piline-like » n'ont pas été décrites comme pouvant former un *pilus stricto sensu* ; on les considère de fait comme des pseudopilines (Pugsley, 1993). Ces protéines ont la particularité d'être synthétisées sous forme de précurseur qui seront soumis à un clivage peptidique (catalysé par la prépiline peptidase : ComC), événement nécessaire à la translocation de ComGC à travers la membrane plasmique (Chung and Dubnau, 1995). La stabilisation intramembranaire de ComGC sera assurée par une oxydoréductase catalysant la formation de ponts disulfures au sein de l'architecture protéique (Chung *et al.*, 1998).

Ainsi, le *pseudopilus* de compétence de *Bacillus subtilis* consiste en un complexe multimérique formé de pseudopilines ComGC dont l'assemblage est permis par l'action des autres pseudopilines de compétence ComC, D, E, G. Les 3 opérons *comE*, *comF* et *comG* sont soumis à la régulation transcriptionnelle de ComK et sont impliqués dans la machinerie assurant l'internalisation de l'ADN.

Une des hypothèses souvent évoquée dans la littérature est qu'à la suite d'un changement de conformation sous le joug de l'action du complexe de transfert, ComEA va transporter l'ADN à travers la membrane. Cette activité est suggérée par la présence d'une séquence particulière



(XXQQQQ) située au niveau de la zone d'ancrage, également observée chez la protéine orthologue de *S. pneumoniae*, qui serait probablement impliquée dans la fixation de l'ADN monocaténaire au complexe de transfert. La seconde étape repose sur un système de sécrétion de type 4 qui constituerait le pore transmembranaire permettant à ComEA d'insérer la molécule d'ADN.

Chez *Bacillus subtilis* et *S. pneumoniae*, l'attachement de l'ADN double-brin s'associe rapidement à la membrane des cellules compétentes pour former un complexe stable (Lorenz and Wackernagel, 1994). Environ 50 sites (*Bacillus subtilis*) et entre 30 et 80 sites (*S. pneumoniae*) sont impliqués dans l'attachement de l'ADN à la membrane (Dubnau 1991). Dans certaines conditions, *Haemophilus influenzae* incorpore aussi l'ADN d'organismes proches (Postel and Goodgal, 1966), mais contrairement aux cas précédents, l'incorporation résulte de la reconnaissance d'une séquence particulière dans l'ADN. Cette séquence USS (pour Uptake Signal Sequence) est dispersée et répétée (environ 1500 copies) dans le génome. L'USS est spécifique de chaque organisme et contient un consensus de 9 pb chez *Haemophilus influenzae* (AAGTGCGGT) et 10 pb chez *N. gonorrhoeae* (GCCGTCTGAA) (Kroll *et al.*, 1998).

Après son attachement à la membrane, l'ADN est découpé en morceaux d'environ 6 kb (*S. pneumoniae*) à 10 kb (*Bacillus subtilis*) (Dubnau and Cirigliano, 1972; Fornili and Fox, 1977). La taille des fragments d'ADN internalisés semble être assez variable puisque chez *Bacillus subtilis* des transformations de fragments d'ADN de 300 pb ont été rapportées (Zawadzki *et al.*, 1995). Pendant l'internalisation, l'ADN monocaténaire pénètre la cellule par son extrémité 3'. Cependant, chez *Haemophilus influenzae*, l'ADN est d'abord transporté sous forme double-brin jusqu'au "transformosome", où il reçoit une protection contre les DNases (Lorenz and Wackernagel, 1994). Ce n'est qu'ensuite qu'il est transféré dans le cytoplasme.

La transformation suit trois processus différents en fonction de la nature de l'ADN.

(i) Dans la transformation par remplacement, l'ADN donneur remplace des séquences homologues présentes dans le chromosome ou les plasmides de l'hôte (receveur). L'ADN donneur et l'ADN receveur interagissent pour former un hétéroduplex ADN receveur/donneur (chez *Bacillus subtilis*, *S. pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*) à partir duquel se fait la recombinaison homologue, conduisant à la substitution de l'ADN receveur par l'ADN donneur, par l'action de la protéine RecA (Lorenz and Wackernagel, 1994). Chez *Bacillus subtilis* la concentration de RecA augmente de 14 fois après l'induction de la compétence (Lovett *et al.*, 1989).



(ii) Pour la transformation par des plasmides, un nouveau réplicon est établi sans recombinaison homologue. Le plasmide linéarisé sous forme monocaténaire est internalisé et régénéré dans le cytoplasme (recircularisation et double-brin). La difficulté de ce processus explique probablement l'efficacité réduite de la transformation par des plasmides, par rapport à celle de fragments d'ADN chromosomique. L'efficacité de la transformation augmente comme le carré de la concentration en plasmides. En effet, il a été suggéré que l'entrée de multiples copies du plasmide facilite la reconstruction plasmidique étant donné que les brins négatif et positif peuvent s'hybrider pour rétablir une molécule circulaire (Saunders and Guild, 1981).

(iii) Enfin, une voie médiane intermédiaire entre les deux premières, consistant en la récupération d'un plasmide localement homologue au chromosome, peut subvenir. La récupération facilitée de plasmides consiste en la reconstruction du plasmide à l'aide d'une recombinaison homologue partielle avec le chromosome. Dans cette voie, l'ADN donneur et le chromosome font l'objet d'une recombinaison homologue sous l'action de RecA. Ensuite, la synthèse de l'ADN et l'action d'une ligase permettent la circularisation de l'ADN monocaténaire (Canosi *et al.*, 1981) qui passe finalement en double-brin. Dans cette voie, l'efficacité de la transformation dépend linéairement de la concentration d'ADN.

Les bactéries dites transformables sont capables de fixer des ADN de multiples origines mais ne sont *a priori* capables de former des recombinaisons génétiques que si la bactérie donneuse et la bactérie receveuse sont génétiquement proches. Cette relative spécificité est liée au fait que l'appariement qui se produit avant la recombinaison exige une étroite homologie des séquences nucléotidiques endogènes et exogènes. Néanmoins, les résultats apportés par l'analyse phylogénétique moderne (séquençage) soutiennent des données contradictoires puisque révélant la présence d'ADN issu de souches phylogénétiquement éloignées dans certains génomes.

#### 4. Les modifications internes du génome bactérien

##### 4.1 La mutation

Une mutation est définie comme toute altération de la séquence en acides nucléiques de la molécule d'ADN transmissible verticalement à la descendance.

##### 4.1.1 Les différents types de mutations

###### a) La substitution

Il s'agit du remplacement d'un nucléotide par un autre. On distingue les transitions des transversions, consistant respectivement à la substitution d'une base purique par une autre (ou



d'une base pyrimidique par une autre) et d'une base pyrimidique par une base purique (ou d'une base purique par une base pyrimidique), respectivement. On distingue 3 catégories de substitutions.

*Faux-sens* : la modification d'un nucléotide peut dans certains cas entraîner la modification de l'acide aminé codé. Les conséquences de ce type d'altérations sur la protéine associée peuvent être extrêmement variables en fonction de la nature de l'acide aminé substitué et de son importance structurale et biochimique.

*Non sens* : la substitution provoque le remplacement du codon par un codon stop (UAA, UAG ou UGA). Il conduit à la production d'une protéine tronquée. Le préjudice de ce type de mutation sera fonction de la localisation du codon muté dans la séquence par rapport au codon stop authentique.

*Silencieuse* : la substitution d'un nucléotide ne modifie pas la séquence d'une protéine en raison de la dégénérescence du code génétique. Ainsi, bien que la séquence ait changé, l'acide aminé résultant sera identique à la séquence native. Ce type de mutation n'a aucune conséquence sur le phénotype.

b) Insertion et délétion (mutations concernant plusieurs bases)

L'insertion ou la délétion d'un nucléotide dans une séquence codante aura pour effet de décaler le cadre de lecture situé en aval de cette dernière (Crick *et al.*, 1961). La conséquence sera, abstraction faite de l'insertion ou du retrait d'un nombre de nucléotides multiples de trois, la production d'une protéine tronquée (apparition d'un codon stop) ou chimérique.

#### 4.1.2 Les causes de mutations

a) Les mutations spontanées

Elles regroupent l'ensemble des mutations liées aux activités métaboliques et biochimiques de la cellule.

##### - L'isomérisation structurale

Les bases azotées peuvent présenter des altérations structurales liées à une modification de leur environnement électronique. La structure des bases azotées, en tant qu'hétérocycles aromatiques, comporte des doubles liaisons conjuguées. Aussi la délocalisation des électrons des orbitales  $\pi$  et le déplacement d'un atome d'hydrogène seront à l'origine de la substitution d'un groupe fonctionnel aboutissant à l'existence d'isomères structuraux, appelés tautomères (formes cétone

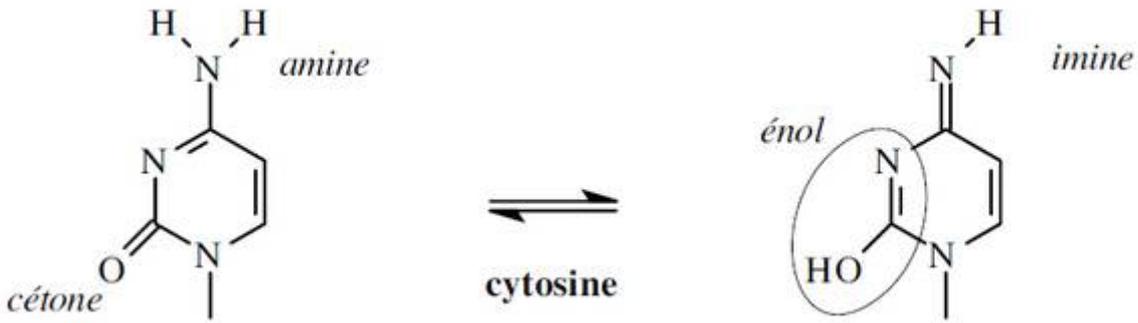
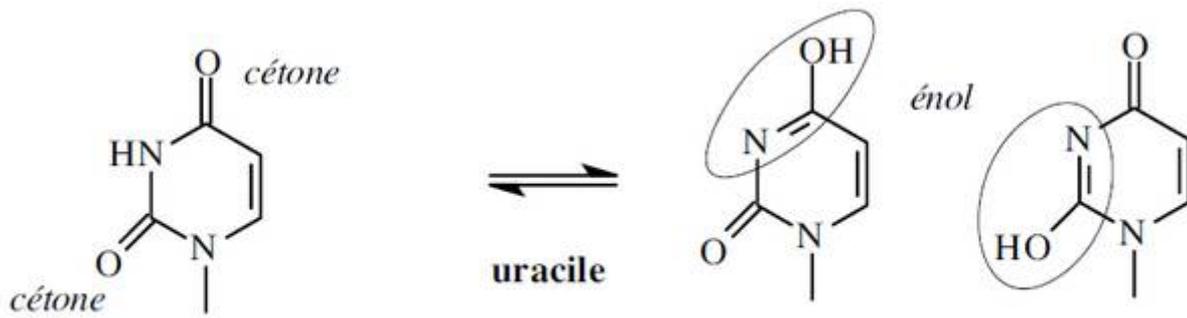


Figure A-45 : isomères céto ou éno , amino ou imino des acides nucléiques.

et énol de la guanine et de la thymine ainsi que des formes imino ou amino de l'adénine et la cytosine) (Figure A-45). Les tautomères présentant une stabilité plus forte, la polymérase sera susceptible d'incorporer une thymine en lieu et place d'une cytosine. Il en résultera un défaut d'appariement, qui deviendra matriciel à la réplication suivante, entraînant une mutation ponctuelle fixée.

#### -Les erreurs de réplifications

##### *Erreur dans la polymérisation*

Bien que l'ADN polymérase soit dotée d'une activité 3'>5' exonucléase, de façon extrêmement rare, elle est susceptible d'incorporer une base non conforme au cours du processus de réplication. Ainsi, un acide nucléique sera substitué par un autre et si l'erreur n'est pas réparée, elle constituera une mutation ponctuelle susceptible d'être fixée dans la descendance.

##### *Le dérapage répliatif*

Les altérations des séquences génétiques imputables à l'ADN polymérase consistent en des ajouts ou retraits de matériel génétique. Ces insertions ou délétions ont pour conséquences un appariement décalée entre les brins (Streisinger *et al.*, 1966). En effet, au cours de la réplication, des boucles peuvent se former dans le brin matrice entre des zones homologues (hairpin), masquant la présence de certains acides nucléiques à la polymérase qui ne les répliquera pas, introduisant de fait une délétion.

De manière intéressante, on notera que ce phénomène de mésappariement peut être exacerbé selon le type de polymérase et la structure de la séquence (Kunkel and Bebenek, 2000). En effet, les séquences répétées et dispersées sont souvent considérées comme des points chauds de mésappariement dans le génome.

#### -La désamination ou la dépurination

##### *-La désamination*

La désamination d'un résidu cytosine ou adénine conduit à la formation d'un uracile ou hypoxanthine *via* la conversion du radical amino en cétone. Le corolaire de ce changement radicalaire sera une altération de la spécificité d'appariement des bases et, tout comme ce qui concerne le phénomène de tautomérie, une erreur d'accolement de la base complémentaire.

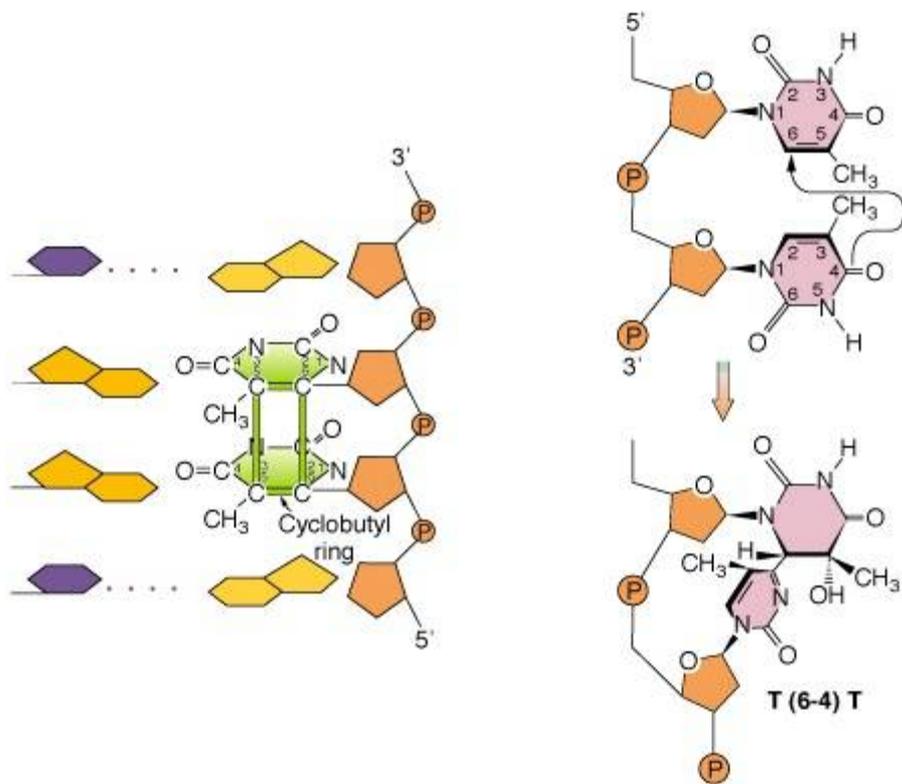


Figure A-46 : dimères de pyrimidines générés par l'exposition aux rayons ultra-violet (UV) (Giglia-Mari and Sarasin, 2003).

### - La dépurination

La dépurination réside dans le retrait d'une base purique dans la double-hélice. En effet, si la liaison base-sucre ou liaison  $\beta$ -osidique entre le N9 de la base et le C1 de l'ose est hydrolysée, un site exempt de base est créé. Si l'erreur n'est pas réparée sur le brin négatif au cours du processus répliatif, alors n'importe quelle base sera associée sur le brin positif. Notons que ce phénomène est utilisé pour le Southern blot afin de réduire la taille des fragments d'ADN à transférer sur la membrane de nylon utilisée pour conduire l'hybridation avec des sondes moléculaires.

### b) Mutations induites

De nombreux paramètres physico-chimiques peuvent également être à l'origine de désamination, diazotation et hydratation conduisant à l'apparition de radicaux anormaux, phénomène intrinsèque à la mutagenèse (Shapiro and Klein, 1966).

### Les analogues de bases

Il s'agit de molécules qui, de par leur structure biochimique, peuvent se substituer aux bases natives de l'ADN. Par exemple, le 5-bromo-uracile est capable de substituer la thymine. Ces mutations dirigées ont pour effet d'augmenter la sensibilité de l'ADN au rayonnement ultra violet.

### Les agents alkylants

Ces molécules sont capables de transposer *in situ* les groupements amino ou cétone en groupement alkyles. Par exemple la N-Méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine est capable de méthyliser la guanine en O6 (Lawley and Thatcher, 1970). Notons que des systèmes de réparation spécifiques ont été décrits chez *E. coli* (Olsson and Lindahl, 1980).

### Les colorants acridiniques et agents intercalants

Les agents intercalants, tel que l'acridine, altèrent la structure des acides nucléiques en s'insérant dans la double-hélice et ont pour effet de décaler le cadre de lecture (Orgel and Brenner, 1961).

### Le rayonnement Ultra violet

Les rayonnements ultra-violet induisent des mutations sur l'ADN. Ces rayons génèrent des dimères de pyrimidines (Cadet *et al.*, 1997a) (Figure A-46).



## Radiations ionisantes

Les radiations ionisantes engendrent la formation de radicaux libres qui peuvent être à l'origine des réactions d'oxydation sur l'ADN (Cadet *et al.*, 1997). Ils induisent aussi la rupture de la liaison phosphodiester (effet clastogène) induisant des cassures de l'ADN mono ou bicaténaire (Pogozelski and Tullius, 1998).

## L'oxydation liée aux radicaux libres

Les radicaux libres (le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'oxygène singulet) sont connus pour induire des altérations structurales de l'ADN, telles que la substitution, les réarrangements ou les insertions (Wiseman and Halliwell, 1996). Tout comme les plantes, les bactéries possèdent des systèmes jugulant le stress oxydatif tels que les régulateurs *oxyR* et *soxRS* codant respectivement pour (i) la catalase, la peroxydase, la glutathione réductase et (ii) la superoxyde dismutase et la glucose-6-phosphate déhydrogénase (Cabiscol *et al.*, 2000).

## 4.2 La transposition

Les éléments transposables (Ets) ont été découverts par Barbara McClintock en 1948, (McClintock, 1948) dans le génome du maïs où ils représentent 50% du génome. Ils sont aussi dispersés dans le génome humain où il représente 35% du génome. Chez les procaryotes, ils constituent de véritables moteurs évolutifs. Les Ets permettent la transposition au sein d'un génome de fragments d'ADN variant de quelques centaines de bases à plusieurs dizaines de milliers de bases. Par ailleurs, pouvant être localisés sur des éléments extra-chromosomiques, les Ets peuvent être échangés d'une population à une autre et être transposés dans différents environnements génomiques. Ils constituent de véritables navettes de gènes et sont responsables pour partie de l'extraordinaire plasticité génétique des génomes bactériens.

### 4.2.1 Nature et mécanisme

Les Ets sont des séquences nucléotiques capables de changer de localisation génomique par transposition. Certains, autonomes, catalyseront seuls leur transposition d'une localisation génomique à une autre tandis que d'autres dépendront de l'activité de facteurs extérieurs.

#### a) Structure des transposons

Les Ets bactériens comprennent de très nombreux membres identifiés comme vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques ainsi que de virulence mais aussi de voies cataboliques de composés xénobiotiques (Martin *et al.*, 1990; Chain *et al.*, 2004) et notamment de pesticides

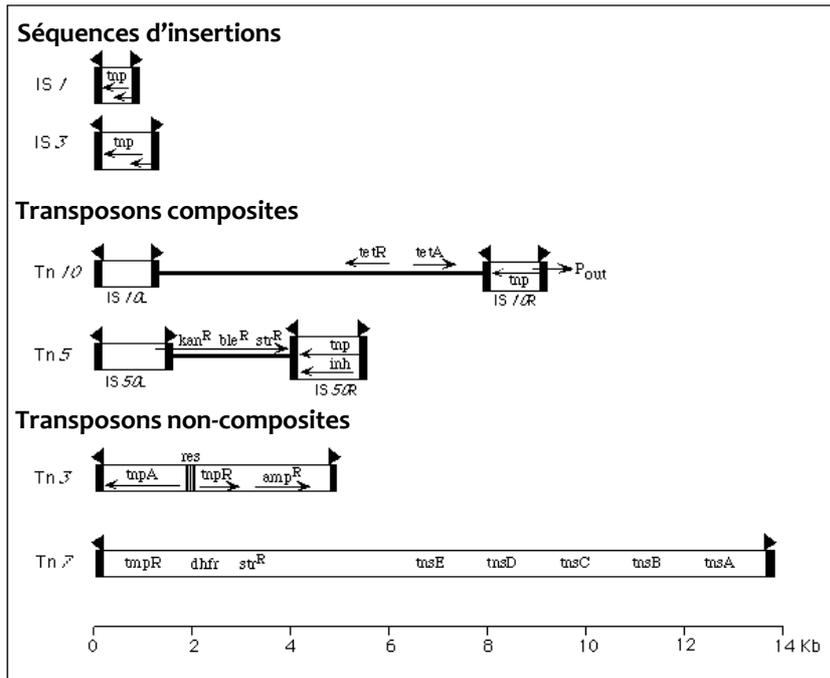


Figure A-47 : exemples d'éléments transposables appartenant à différentes classes : (i) séquences d'insertions qui possèdent un gène codant une transposase (*tnp*) (ii) les transposons composites (flanqués d'IS) et les (iii) transposons non composites (dépourvus d'IS). Ces transposons, composites ou non, sont très souvent impliqués dans le transport de gènes de résistance ou cataboliques (Galas *et al.*, 1989).



Figure A-48 : Schéma d'un élément transposable. Les séquences inversées répétées IRL et IRR (schématisées en rouge) sont présentes aux extrémités de l'élément transposable. Elles possèdent un domaine B pour la fixation de la transposase et un domaine terminal A qui correspond au site de coupure de l'enzyme. Les lettres XYZ à l'extérieur de l'élément transposable représente de courtes séquences directes répétées formées lors de l'insertion de l'élément transposable dans une séquence d'ADN. La séquence interne de l'élément transposable est de composition et de taille variables. Ce schéma représente l'élément transposable le plus simple (l'IS), qui ne contient qu'un seul gène (en jaune) codant pour la transposase.

(Vallaeys *et al.*, 1999). Les Ets sont composés d'un gène codant une transposase (ou rétrotransposase) et de séquences répétées inversées (IR) flanquant de part et d'autre les Ets. Les transposases connues appartiennent à 2 catégories distinctes : celles ne formant pas d'intermédiaire covalent avec l'ADN et celles formant un intermédiaire covalent avec l'ADN telles que les transposases à tyrosine, à sérine, et les transposases Y2 (Curcio and Derbyshire, 2003). Les transposases à motif DDE requièrent deux ions métalliques pour permettre le clivage et la re-ligation de l'ADN (Kulkosky *et al.*, 1992).

#### b) Nomenclature des transposons

La nomenclature des transposons reste un sujet de débat scientifique, puisqu'elle peut reposer sur leur structure, les motifs de la transposase ou sur leur mécanisme de transposition (Finnegan, 1989). Néanmoins chez les bactéries on comptera surtout la classe I (les IS) et la classe II (les transposons) (Figure A-47).

##### -Classe I : Les IS

Les IS constituent les éléments transposables bactériens ubiquistes qui furent identifiés par les effets de leur insertion dans une séquence codante. De localisation génomique ou plasmidique, leur taille varie habituellement de 800 à 2000 pb. Les IS ne contiennent pas beaucoup plus que le gène codant la transposase qui catalyse leur transposition (Ohtsubo *et al.*, 1996) (Figure A-48). En conséquence, les IS ne transportent que peu de gènes. Ils présentent des IR qui constituent le site de reconnaissance de la transposase. A titre d'exemple, l'IS $\beta$  (1258 pb) est composé d'IR (séquences inversées répétées) de 39 pb aux extrémités de deux cadres ouverts de lecture ORFA et ORFB comprenant respectivement 288 et 99 codons. ORFA code pour la partie N-terminale (288 acide aminés) et ORF B code pour la partie C-terminale de la transposase. On notera que la séquence de Shine-Dalgarno d'ORFA est rendue inaccessible à la polymérase puisque séquestrée au sein d'une boucle qui ne se relâchera que pour la transposition (Timmerman and Tu, 1985) prévenant ainsi l'activation de la transposition par les promoteurs externes à l'IS.

##### -Classe II : Les transposons Tn

Contrairement aux IS les transposons d'une taille plus importante sont capables de mobiliser plusieurs éléments génétiques étrangers par le phénomène de transposition. A titre d'exemple, le transposon Tn7, porteur de plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, atteint la taille de 17 kb (Craig, 1996). Généralement trois catégories de transposons sont distinguées :

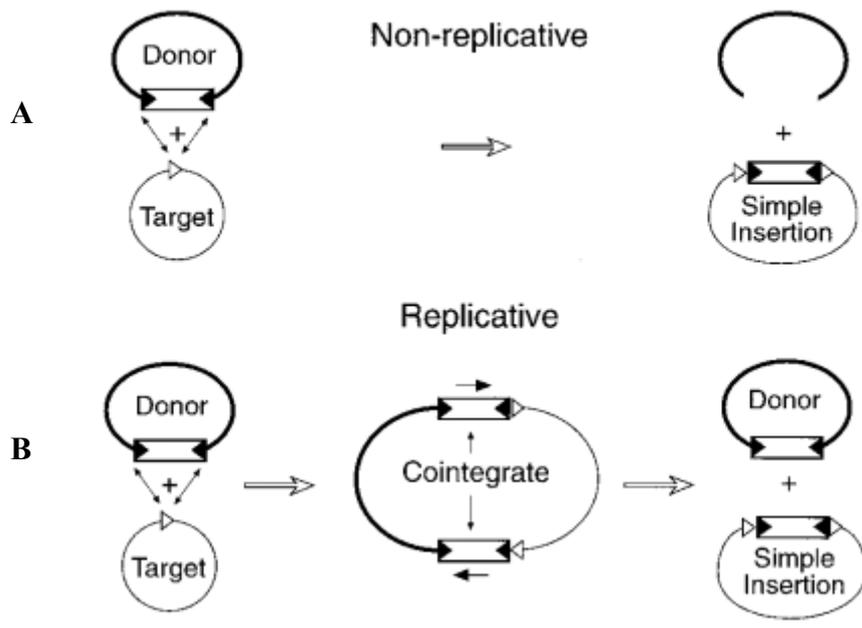


Figure A-49 : les deux types de transposition (Hallet and Sherratt, 1997).

A : la transposition non réplivative (couper-coller)

B : la transposition réplivative (copier-coller)

- les transposons simples : encadrés par deux IR, ils codent pour une transposase (capable de reconnaître les IR) et une résolvasse assurant la recombinaison site-spécifique des copies générées lors de la transposition répllicative (Grindley *et al.*, 1982).
- les transposons composites : ce sont des éléments constitués de plusieurs séquences d'insertions éventuellement associées à des fragments d'ADN codant pour des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes de virulence ou des gènes métaboliques. Flanqués de séquences d'insertions (orientées dans le même sens ou inversées), ils possèdent une transposase capable de les reconnaître. Ils constituent des candidats efficaces au transport de gènes, comme le témoigne l'étude ayant caractérisé le transfert du gène de résistance à la tétracycline par le transposon composite (puisque flanqué d'IS) Tn10 (Hillen and Schollmeier, 1983).
- les transposons non-composites : ils présentent des séquences répétées inversées et ne sont en revanche pas flanqués de séquences d'insertions. Comme les transposons composites, ils sont capables de mobiliser des gènes entiers et sont à ce titre très impliqués dans l'acquisition de résistance aux antibiotiques (Blazquez *et al.*, 1993).
- les transposons conjugatifs : ces transposons de grande taille sont transmis par conjugaison bactérienne. Ils sont considérés comme des transposons mais ils en divergent par leur mode d'excision et d'intégration (Salyers *et al.*, 1995). Proche d'une structure plasmidique, ils utilisent un intermédiaire circulaire, non autonome, et sont porteurs de gènes de résistance (Whittle *et al.*, 2002).

### c) Mécanisme de la transposition

La transposition répond à deux mécanismes distincts et n'ayant pas les mêmes conséquences en termes de multiplication du gène transposé (Figure A-49).

#### ➤ Conservative

La transposition conservative du type "couper-coller" consiste à exciser l'élément transposable de sa localisation génomique initiale et à l'insérer dans une nouvelle localisation génomique. La molécule donneuse ne conservera pas de copie de l'élément transposable. Ce phénomène correspond à une délétion génétique (Haren *et al.*, 1999).

Il existe trois types de transpositions conservatives selon le type de coupure et d'insertion catalysées par trois catégories distinctes d'enzymes que sont les transposases à motif DDE, les résolvasse invertases et la famille des Int $\lambda$ . Ainsi, ces trois enzymes catalysent les réactions de

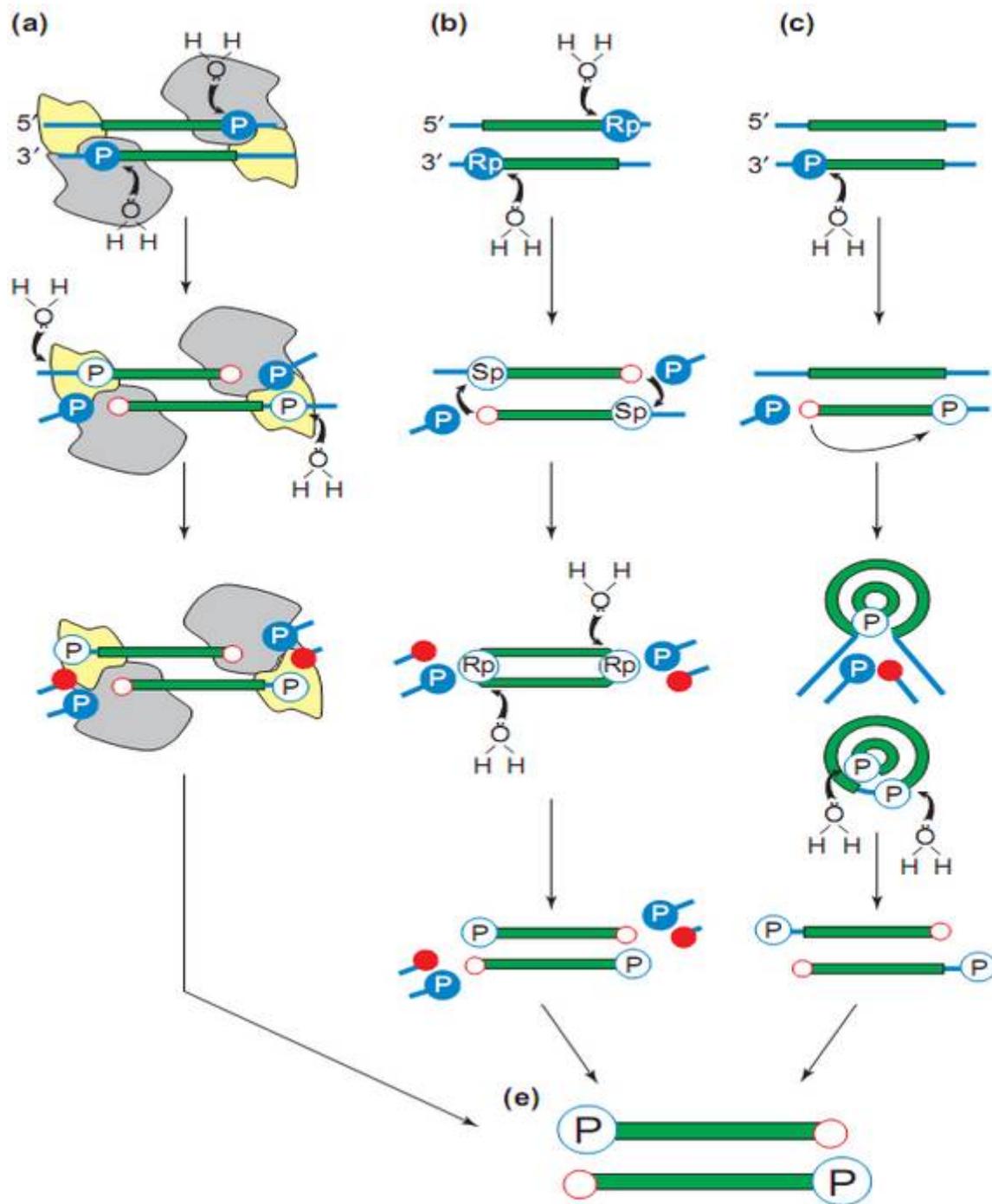


Figure A-50: les trois modes de transposition conservative.

- a) Les deux extrémités sont rompues : formation de la structure en épingle.
- b) Les deux extrémités sont rompues : formation de la structure de Shapiro.
- c) Une seule extrémité est rompue : formation d'un intermédiaire circulaire.

manières différentes ; une trans-esterification en une étape pour la DDE et en deux étapes pour les autres (Hallet and Sherratt, 1997).

La première étape de ce processus est la reconnaissance des IR flanquant l'élément transposable par un multimère de transposase, formant une structure mixte ADN-protéine, le complexe synaptique. La transposase hydrolyse les liaisons phosphodiester de l'un des deux brins d'ADN, découvrant une ou deux extrémités 3'OH. Dans le cas de la formation de deux extrémités 3'OH l'une des extrémités va alors attaquer l'autre extrémité 3'OH ou directement la séquence cible, laissant dans les deux cas apparaître deux extrémités 5'P.

Dans le premier cas, la conséquence de l'interaction des extrémités du transposon aboutit à la formation d'une structure en épingle à cheveux qui s'intégrera dans la séquence cible (Kennedy *et al.*, 2000). Le rôle du complexe synaptique est d'assurer la continuité de l'attaque de l'autre côté de l'ADN cible par l'autre extrémité 3'OH du transposon (Figure A-50 a).

Dans le second cas, les extrémités 3'OH vont attaquer les liaisons phosphodiester de la séquence cible et suite à une trans-esterification, s'y lier de manière covalente. L'excision du transposon de la molécule donneuse n'étant à ce stade pas encore effective, il se forme un duplex nommé structure de Shapiro (Shapiro, 1979) (Figure A-50 b). La coupure des autres extrémités du transposon aboutira à la résolution de la structure de Shapiro.

Les deux césures dans l'ADN, en regard des extrémités 5'P du transposon seront comblées par l'action d'une ADN polymérase et étant donné la complémentarité des séquences de l'ADN hôte avant transposition, cette polymérisation aboutira à la création de répétitions de part et d'autre d'un transposon nouvellement intégré (Figure A-50 c).

Dans le cas où seule une extrémité 3'OH a été produite, cette dernière va diriger son attaque vers l'autre extrémité du transposon aboutissant à la formation d'une structure circulaire séparée de la molécule donneuse (Scott *et al.*, 1988).

#### ➤ Répllicative

La transposition répllicative du type "copier-coller" consiste à dupliquer l'élément transposable *via* la formation d'un co-intégrat et à l'insérer dans un autre environnement génomique *via* la résolution du co-intégrat. Tout comme pour la transposition conservative, les monomères de transposases se fixent aux deux extrémités du transposon pour former le complexe synaptique.

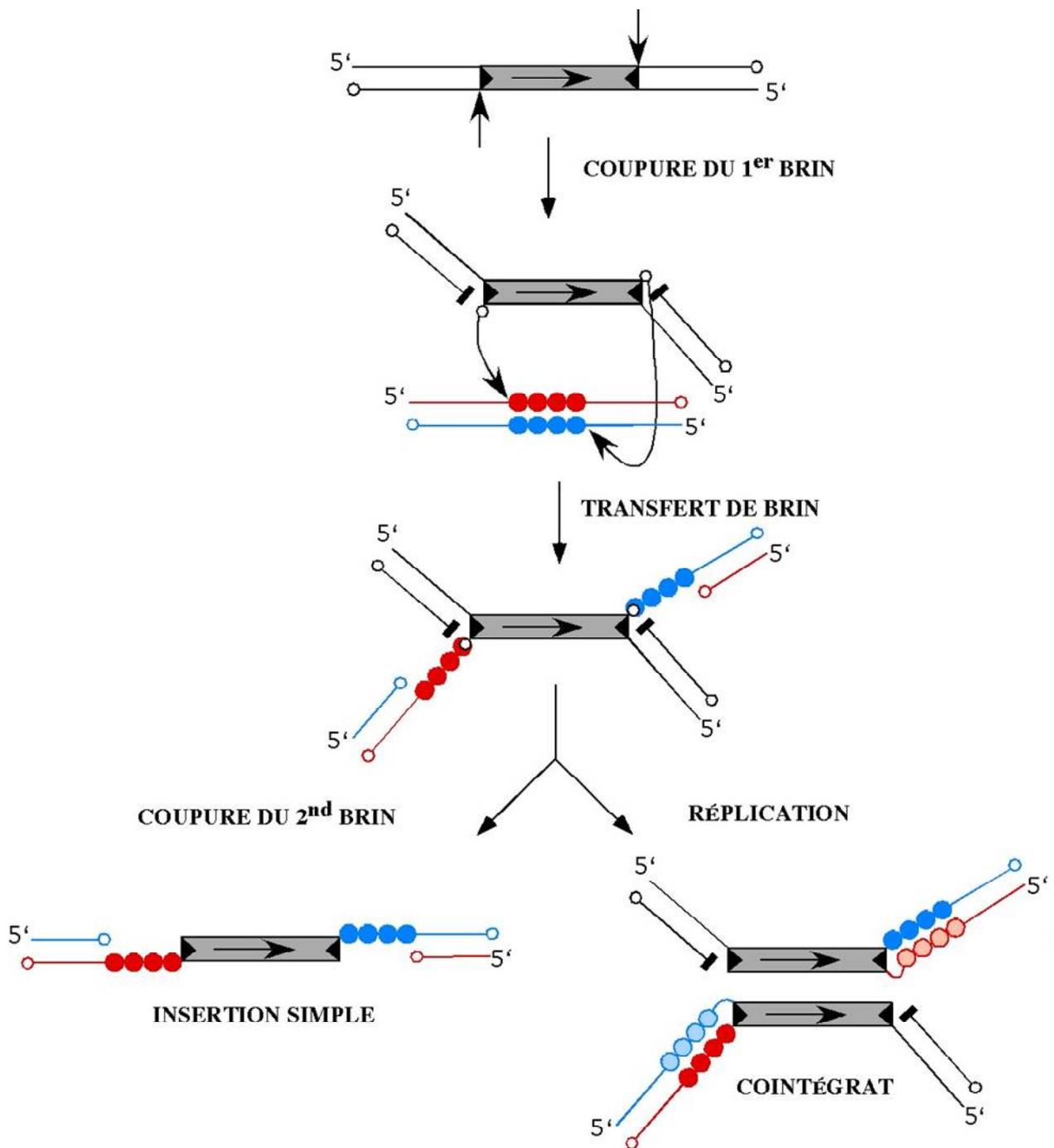


Figure A-51 : la transposition répllicative (Serre, 2005).

D'abord il y a coupure au niveau des extrémités du transposon, puis ligation au niveau de la molécule cible, la répllication aboutira à la formation d'un coïntégrat qui sera résolu pour former un doublon de la séquence.

L'ouverture de la molécule réceptrice se fait également par l'attaque nucléophile des extrémités 3'OH sur le fragment. Le transposon est donc à ce stade toujours accroché au fragment donneur (Haren *et al.*, 1999). Les extrémités 3'OH du transposon étant liées à l'ADN cible suite à la transesterification, et les extrémités 5'P étant encore liées à la molécule mère, l'ensemble forme alors une double molécule d'ADN entrelacée. La structure s'apparente à une fourche de réplication, l'extrémité 3'OH de l'ADN cible sert alors d'amorce à la polymérase qui s'arrêtera au niveau de la seconde boucle de réplication du complexe. Ainsi, deux copies du transposon seront générées. Un événement de recombinaison homologue entre ces deux copies aura pour effet la résolution de la structure de Shapiro et le maintien d'un unique exemplaire du transposon dans la molécule cible (Figure A-51).

A l'avenant de la transposition conservative, des extrémités de part et d'autre du transposon se retrouveront directement répétées.

### Impact des éléments transposables sur l'évolution des génomes

#### *- Insertions de gènes*

L'insertion d'éléments génétiques mobiles par la transposition contribue à la plasticité des génomes microbiens et explique en partie l'extraordinaire adaptabilité des populations microbiennes. Ces mécanismes d'évolution moléculaire sous-entendent le recrutement de gènes codant des enzymes, conférant une nouvelle fonction à caractère adaptatif sélectionné dans des environnements favorables. Ainsi, la formation d'îlots de pathogénicité, comportant plusieurs gènes de virulence, résulte de l'activité d'éléments d'insertion (Hacker and Kaper, 2000). De manière semblable, l'acquisition de gènes de résistance est relayée par l'activité de transposons. De plus, des travaux conduits au laboratoire sur le modèle de biodégradation de l'atrazine, ont montré que :

- les gènes *atzA* et *atzB* avaient été transposés du plasmide pADP1 vers le chromosome bactérien de *Variovorax* sp. MD1 (Devers *et al.*, 2007b) par une transposition conservative relayée par l'IS1071 ;

- qu'en réponse à l'exposition répétée de *Pseudomonas* sp. ADP à l'atrazine, une souche nouvellement évoluée, présentant un gain de fitness, présentait une duplication du gène *atzB*. Cette duplication résulte d'une transposition répllicative relayée par l'IS1071 (Devers *et al.*, 2008).

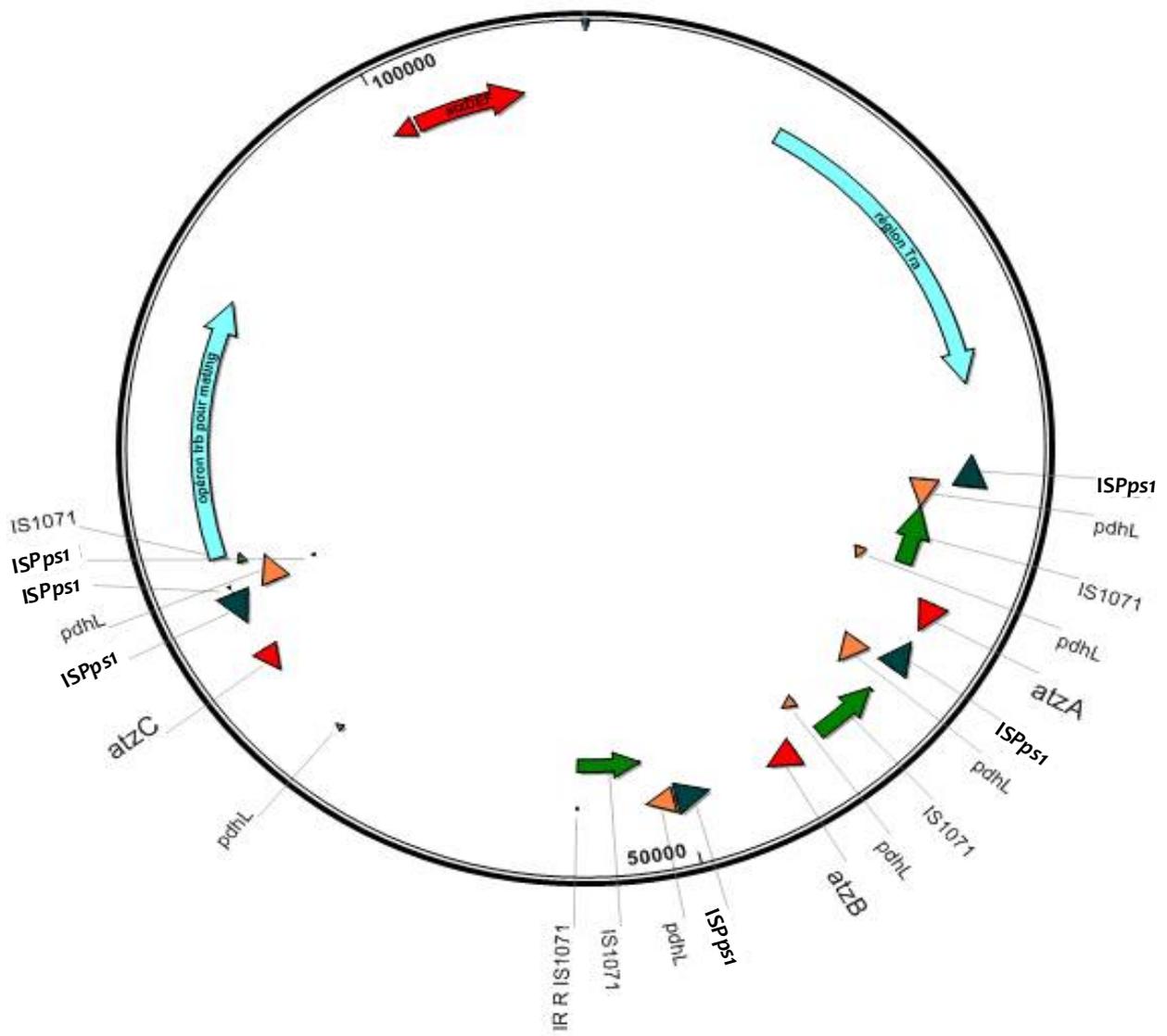


Figure A-52 : carte du plasmide pADP1 de *Pseudomonas* sp. ADP représentant les gènes dégradation et les éléments d'insertion (IS) et *pdhL* like.

Ces observations montrent que les transposons sont le moteur de l'évolution des génomes microbiens et contribuent en conséquence à conférer des capacités adaptatives aux populations microbiennes peuplant les différentes niches de l'environnement.

### Caractéristiques des IS flanquant les gènes de dégradation sur pADP1

Le plasmide conjugatif contient de nombreuses séquences d'insertions répétées à l'origine de la mobilisation des gènes de dégradation.

Ils ont en effet été décrits comme un autre moteur de la transposition et de la dispersion des ces gènes au sein d'une même cellule mais également entre plusieurs cellules (Chakrabarty *et al.*, 1978; van Beilen *et al.*, 2001a; Van Beilen *et al.*, 2001b; Cérémonie *et al.*, 2006).

On compte 3 types d'IS majeurs organisés sur le plasmide pADP1 de *Pseudomonas* sp. ADP. Certaines sont répétées et flanquent les gènes de dégradation. Parmi ces IS on compte l'ISPps1 en 6 exemplaires (dont 2 tronqués), l'IS1071 en 7 exemplaires (dont 4 tronqués) et l'IS pdhL like en 7 exemplaires dont 3 tronqués. Elles sont toutes situées entre *traC* et *trbN* (Figure A-52). Ces IS sont probablement responsables des insertions dans le plasmide pADP1. Par exemple, si *atzA* et B possède un pourcentage en G+C proche de celui du reste de la séquence, *atzC* présente un pourcentage plus faible révélant une provenance exogène.

#### ➤ **ISPps1**

Cette séquence d'insertion publiée pour la première fois en 2001 par Eaton (IS Finder), comporte 1863 pb et est similaire à 35% à l'IS1294. L'organisme chez qui elle a été décrite est *Pseudomonas buttiensis* mais elle a ensuite été retrouvée chez *Pseudomonas buttiensis* NRRLB-12228, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 et *Acidovorax avenae* (Romantschuk *et al.*, 1991). Elle appartient à la famille des IS91 qui peut être distinguée des autres familles car à ses extrémités sa séquence contient des séquences inversées dont la répétition est aléatoire mais également des séquences flanquantes différentes (Mendiola *et al.*, 1992). De plus, des répétitions directes ne sont pas générées à l'insertion et la transposase codée par *tnpA* n'appartient pas à la classe DDE. Le type de mécanisme de transposition est de type cercle roulant (Mendiola and de la Cruz, 1992).

Ces types d'IS encadrent fréquemment les gènes de virulence ou de toxicité ainsi que ceux impliqués dans la dégradation des composés organiques (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2002).

#### ➤ **IS1071**

Identifiée pour la première fois en 1991 (Nakatsu *et al.*, 1991) à proximité de gènes de la voie de dégradation du chlorobenzoate, elle est fréquemment retrouvée à proximité des gènes présents



sur les plasmides cataboliques. Ceci indique le rôle majeur que ces séquences ont joué dans la mobilité et l'acquisition des ces gènes ; cet élément appartenant aux transposons de classe II est constitué d'une séquence de 3200 pb et présente des IR de 110 pb à ses extrémités. Sa transposase le rapproche de la famille Tn3 (Di Gioia *et al.*, 1998) chez laquelle la transposition s'effectue au travers d'un mécanisme réplcatif en deux étapes, produisant à chaque insertion la duplication de 5 pb sur la séquence cible. Les IS de cette famille portent les gènes nécessaires à leur transposition mais l'IS1071 est dépourvue de l'activité résolvasse.

#### 4.3 Délétions de gènes

La délétion de régions génomiques peut se produire par recombinaison homologue consécutive à une insertion d'éléments transposables (Mazodier and Davies, 1991). Les évènements de délétions constituent également des facteurs importants dans l'aspect évolutif des génomes procaryotiques contribuant à leur rétractation. Les phénomènes de délétions expliquent pourquoi les génomes microbiens ne sont pas en constante expansion comme pourrait le laisser présager la seule activité des transposons réplcatifs. Les délétions peuvent modifier la taille du génome de façon significative. Ainsi, chez *Mycobacterium tuberculosis*, des délétions peuvent entraîner une diminution de la taille du génome de 0,3% sans atteindre sa survie (Kato-Maeda *et al.*, 2001). D'un point de vue énergétique et de surcroît évolutif, la perte de gènes, dont la transcription est constitutive, peut être à l'origine d'une réduction du temps de génération inhérente aux économies métaboliques réalisées en raison de l'élimination d'un fardeau génétique.



## **OBJECTIFS ET HYPOTHESES**



## OBJECTIFS ET HYPOTHESES

En regard de cette synthèse bibliographique et suite aux travaux menés par le groupe de recherche de F. Martin-Laurent (UMR MSE, INRA Dijon), mes travaux de thèse ont consisté à étudier les ressorts de l'adaptation des communautés microbiennes à la biodégradation des pesticides. Cette fonction microbienne présente un intérêt environnemental évident puisqu'elle contribue à diminuer la persistance des pesticides et, par conséquent, limite leur dispersion dans l'environnement. Elle est une des clefs de voûte de la fonction écosystémique filtre remplie par les sols agricoles. Toutefois, malgré cet intérêt agro-environnemental, les processus conduisant à l'apparition et à l'optimisation du fonctionnement des communautés microbiennes dégradant les pesticides restent obscurs. Les travaux conduits par mon laboratoire d'accueil ont montré que l'herbicide atrazine constituait un modèle d'étude pour appréhender ces questions. En effet, de nombreuses connaissances ont été acquises ces dernières années (souches dégradantes isolées, voie métabolique entièrement décrite, gènes de dégradation caractérisés, techniques moléculaires disponibles pour les quantifier dans l'environnement,...) autorisant le développement d'approches innovantes dans le domaine de l'écologie évolutive microbienne. Fort des connaissances acquises par mon laboratoire d'accueil montrant l'extraordinaire plasticité des communautés et des populations microbiennes dégradant l'atrazine, j'ai développé une recherche visant à étudier les mécanismes impliqués dans la dynamique adaptative des communautés microbiennes dégradant l'atrazine. Pour ce faire, j'ai développé une approche intégrative considérant les différents niveaux d'organisation du vivant en allant (i) du niveau infra-cellulaire (gène, enzyme de dégradation), (ii) en passant par le niveau cellulaire et populationnel de souches dégradantes (iii) pour finir par étudier les mécanismes adaptatifs à l'échelle des communautés dégradantes. Ces différents niveaux d'échelle ont été étudiés pour répondre à différents types de questionnement ayant pour trame de fond l'amélioration de la fonction de dégradation de l'atrazine :

- Quelle est l'importance de la fixation de mutation dans le gène *atzA* dans des populations dégradant l'atrazine ?
- Comment évolue une population dégradante soumise à une pression de sélection d'atrazine constante ? *A contrario*, comment cette population évolue-t-elle quand elle est exposée à son métabolite intermédiaire, l'acide cyanurique ?



- Comment, à l'échelle de la communauté, le potentiel génétique dégradant se répartit-il ? Est-il rassemblé au sein d'une seule population ou est-il partagé au sein de la communauté dégradante ?

➤ **Axe 1 : Diversité génétique du gène *atzA* au sein de populations microbiennes dégradant l'atrazine : impact sur l'activité catalytique des chlorohydrolases et conséquence sur l'évolution des populations dégradant l'atrazine.**

L'état de l'art indique que les gènes *atz* codant les enzymes de dégradation de l'atrazine ne présentent pas un polymorphisme important. L'hypothèse communément admise pour expliquer cette observation est, qu'en raison de leur recrutement récent (20 ans tout au plus) au sein de la voie catabolique *atz*, ces gènes n'ont pas encore eu le temps de diverger. Seffernick *et al* (2001) rapportait que le gène *triA* qui présente 99% de similarité avec le gène *atzA*, et code la mélamine déaminase, pourrait constituer l'origine du gène *atzA*. Par ailleurs, malgré 99% de similarité partagée par *triA* et *atzA*, les enzymes codées présentent des spécificités de substrat tout à fait différentes. Plus récemment, Scott *et al.* (2010) ont montré que quelques mutations accumulées dans le gène *triA* codant l'enzyme dégradant la mélamine étaient responsables de l'apparition du gène *atzA* codant l'atrazine chlorohydrolase transformant l'atrazine en hydroxyatrazine (Scott *et al.*, 2010). Par ailleurs, des auteurs ont rapporté l'existence chez *Herbaspirillum* sp. B601, une souche dégradant l'atrazine isolée de la rhizosphère du maïs, du gène *smzA* présentant 99% d'homologie avec le gène *atzA* (Bazhanov and Yatsevich, 2007). Même si des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'origine évolutive de *smzA* (c'est-à-dire *triA* ou *atzA*), ces observations tendent à montrer que les gènes codant la chlorohydrolase responsable de la première étape de la transformation des *s*-triazines sont en cours d'évolution sous la pression de sélection exercée par leur application répétée dans les cultures de maïs.

Par conséquent, j'ai cherché à caractériser l'existence éventuelle d'un polymorphisme de séquences du gène *atzA* au sein d'une collection de souches dégradant l'atrazine disponible au laboratoire (Rousseaux *et al.*, 2001; Udiković Kolić *et al.*, 2008; Udiković-Kolić *et al.*, 2010). Pour ce faire, j'ai développé une approche reposant sur le clonage et le séquençage des gènes *atzA*. L'analyse des séquences nucléotidiques et des séquences en amino acides m'a permis d'identifier des mutations non silencieuses dans le gène *atzA*. Afin d'explorer plus en avant l'importance de ces mutations dans l'évolution des capacités métaboliques d'AtzA, nous avons développé un travail en collaboration avec l'équipe de Colin Scott (CSIRO, Australie). J'ai adressé les clones recombinants contenant les séquences *atzA* à Sajid Noor, en thèse sous la direction du Dr Colin Scott, qui a réalisé les expériences de biochimie destinées à sur-exprimer ces protéines et à mesurer leur activité spécifique vis-à-vis de l'atrazine mais aussi vis-à-vis d'autres *s*-triazines.



L'importance des amino-acides mutés a été évaluée par la modélisation de la structure tridimensionnelle des enzymes mais aussi par mutagenèse dirigée par PCR suivies de la surexpression de la protéine mutée.

➤ **Axe 2 : Approche d'écologie évolutive in vitro : évolution du potentiel génétique de population microbienne dégradante soumise à la pression de sélection de l'atrazine et de l'acide cyanurique.**

Les populations bactériennes colonisent la plupart des niches écologiques terrestres et aquatiques. Ces microorganismes unicellulaires peu mobiles possèdent une extraordinaire adaptabilité physiologique leur permettant de résister à différents stress mais aussi une adaptabilité génétique, héritable à la descendance (malgré le caractère clonale de la descendance). Cette dernière, leur permet d'acquérir du matériel génétique par voie horizontale leur conférant ainsi de nouvelles propriétés améliorant leur compétitivité, survie et développement. L'apparition de populations bactériennes capables de minéraliser les pesticides en réponse à leur application répétée constitue un modèle intéressant pour étudier les mécanismes génétiques sous-jacents responsables du recrutement, de l'arrangement et de la propagation de gènes de dégradation au sein des populations constituant la communauté microbienne dégradante. Mon équipe d'accueil a ainsi montré que le plasmide catabolique pADP1::Tn5 portant les gènes de dégradation *atx* était échangé par conjugaison bactérienne au sein de la microflore du sol, montrant l'importance du transfert horizontal de gène (HGT) pour la propagation de cette fonction au sein de la communauté microbienne (Devers *et al.*, 2005). De plus, ils ont aussi pu montrer que les gènes *atxAB* de la voie haute pouvaient être transférés d'une localisation génomique à une autre (de pADP1 vers le chromosome bactérien) par recombinaison homologue conservative médiée par l'IS*Pps1* (Devers *et al.*, 2007b) et que le gène *atxB* était dupliqué par recombinaison homologue répliquative médiée par l'IS*Pps1* chez *Pseudomonas* sp. ADP en réponse à la pression de sélection exercée par l'atrazine (Devers *et al.*, 2008). Ces observations illustrent la plasticité génétique des populations microbiennes génétiquement aptes à dégrader l'atrazine. Elles encouragent à étudier plus en profondeur ces mécanismes pour appréhender, d'une part, la tendance évolutive des populations microbiennes dégradant l'atrazine et, d'autre part, le niveau de stabilité des voies métaboliques formées.

Pour appréhender ces questions, j'ai développé une première expérimentation destinée à évaluer la tendance évolutive de *Pseudomonas* sp. ADP maintenue sous une pression de sélection élevée. Cette expérimentation d'écologie évolutive s'inscrit dans la continuité des expérimentations menées par Devers *et al.* (2008). Pour la conduire, *Pseudomonas* sp. ADP T34 a été cultivée de



manière répétée sur un milieu minéral contenant de l'atrazine (100 mg L<sup>-1</sup>) comme seule source d'azote. Les études physiologiques (cinétiques de croissance et de dégradation) ont permis de montrer l'apparition d'une population nouvellement évoluée. J'ai par la suite caractérisé les modifications du potentiel génétique ayant eu lieu dans la souche nouvellement évoluée.

La seconde expérimentation a consisté à évaluer la stabilité du potentiel génétique dégradant. En effet, de nombreuses études montrent qu'en absence de pression de sélection, le potentiel dégradant des souches était perdu. Bien que ces observations aient été rapportées par différents auteurs, les mécanismes conduisant à la disparition du potentiel dégradant n'ont que rarement été étudiés. C'est pourquoi, j'ai mis en place une expérience d'écologie évolutive en appliquant une pression de sélection continue sur la voie basse (*atz<sub>DEF</sub>*) exercée par l'acide cyanurique, intermédiaire métabolique issu de la voie haute (*atz<sub>ABC</sub>*) de la dégradation de l'atrazine. Pour ce faire, la population *Pseudomonas* sp. ADP a été cultivée sur un milieu minéral additionné d'acide cyanurique (2 g L<sup>-1</sup>) comme seule source d'azote. Les études physiologiques (cinétiques de croissance et de dégradation) ont montré l'apparition d'une population nouvellement évoluée se développant plus rapidement sur le milieu additionné d'acide cyanurique. J'ai par la suite caractérisé les modifications du potentiel génétique ayant eu lieu dans la souche nouvellement évoluée.

➤ **Axe 3 : Approche communautaire : construction d'un outil pour évaluer l'évolution du potentiel génétique d'une communauté microbienne dégradant l'atrazine.**

L'état de l'art montre que l'acquisition d'une voie métabolique dégradant des pesticides repose sur le transfert horizontal de gènes (HGT) et sur la transposition d'îlots cataboliques d'une localisation génomique à une autre. La plupart des études conduites *in vitro* sous pression de sélection atrazine élevée semblent indiquer que les souches microbiennes isolées hébergent la voie catabolique assurant la transformation complète de l'atrazine. Cependant, des études récentes mettent en évidence la notion de coopération métabolique, suggérant qu'à l'échelle de la communauté, le potentiel génétique dégradant puisse être partagé entre les populations le constituant. L'équilibre entre ces deux situations extrêmes constitue les conditions de la persistance et de l'optimisation de la fonction de dégradation dans l'environnement. Dans ce contexte, l'objectif principal de cet axe sera d'appréhender l'*optimum* de la fonction de biodégradation de l'atrazine au sein de la communauté microbienne le dégradant. De manière



plus générale, il devrait contribuer à augmenter nos connaissances sur les mécanismes génétiques sous-jacents impliqués dans le transfert d'information génétique d'une population microbienne à une autre (transfert horizontal de gène, réarrangement génétique,...) ainsi que sur les mécanismes d'adaptation d'une communauté bactérienne à la dégradation de pesticides.

Pour atteindre cet objectif, j'ai choisi de travailler à partir d'une communauté dégradante synthétique, composée de quelques membres dont les caractéristiques physiologiques et génétiques sont connues, en adoptant une approche d'écologie évolutive. Pour atteindre cet objectif, le pré-requis a été le développement d'un outil microbien. Dans ce cadre, j'ai participé à la caractérisation génétique et physiologique d'une nouvelle souche microbienne dégradant l'atrazine isolée d'un sol agricole. Par ailleurs, j'ai choisi dans le souchier du laboratoire, des souches dégradantes présentant différents potentiels génétiques (voie haute, voie basse, voie complète) mais ayant des vitesses de croissance similaires sur un milieu minéral additionné d'atrazine ou sur milieu riche (type Trypton-Yeast). Pour chacune des souches retenues, j'ai mené des expérimentations de microbiologie pasteurienne destinées à sélectionner des souches double-résistantes à des antibiotiques. L'objectif souhaité est de pouvoir suivre l'évolution de la composition de la communauté microbienne dégradante au cours de la culture. Ces développements méthodologiques étant consommateurs de temps, je ne présenterai dans ce manuscrit de thèse que des résultats préliminaires validant la mise au point de la boîte à outils microbienne et moléculaire.



# **MATERIELS ET METHODES**

**Tableau B-I : liste des souches bactériennes employées dans cette étude : [Atr<sup>+</sup>] Dégrade l'atrazine ; [AC<sup>+</sup>] Dégrade l'acide cyanurique; [Spn<sup>R</sup> ] Résistante à la spectinomycine; [Kan<sup>R</sup>] Résistance à la kanamycine; [Stp<sup>R</sup> ] Résistante à la streptomycine; [Trc<sup>+</sup>] Résistante à la tétracycline.**

Souches	Localisation	Phénotype	Composition gènes	Nombres de plasmides	Références
<i>Chelatobacter heintzii</i> Sal 1	Salinis, France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	Nd	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> Sal 1-3	Salinis, France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	Nd	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> LR3-3	Le rheu, France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	7	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> Lous2-3	Loustalet, France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	6	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> Bacc 2-3	Baccon, France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	7	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> Lous 5	Loustalet , France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	Nd	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> LR1-3b	Le rheu , France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	Nd	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> Pelt-4	La bouzule, France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	Nd	Rousseaux et al., 2001
<i>Chelatobacter heintzii</i> Bacc 6	Baccon , France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC]	trzN, atzB, atzC	Nd	Rousseaux et al., 2001
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP0	USA	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC <sup>+</sup> ]	atzABCDEF	2	Mandelbaum et al., 1995
<i>Pseudomonas</i> sp. ADPE	Laboratoire	[Atr <sup>-</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]	atzDEF	2	Cette étude
<i>Pseudomonas</i> sp. ADPE	Laboratoire	[Atr <sup>-</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]; [Stp <sup>R</sup> ]; [Rif <sup>R</sup> ]	atzDEF	2	Cette étude
<i>Pseudomonas</i> sp. T34	Laboratoire	[Atr <sup>++</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]	atzAB(2)CDEF	1	Devers et al., 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. T34-100	Laboratoire	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]	atzAB(2)CDEF	2	Cette étude
<i>Variovorax</i> 38R	France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]; [Spn <sup>R</sup> ]; [Kan <sup>R</sup> ]	atzABCDEF	Nd	Cette étude
<i>Chelatobacter heintzii</i> SR 38	France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]; [Stp <sup>R</sup> ]; [Kan <sup>R</sup> ]	atzABC, trzD	Nd	Cette étude
<i>Methylopila</i> sp. TES	France	[Atr <sup>+</sup> ]; [AC <sup>-</sup> ]; [Spn <sup>R</sup> ]; [Rif <sup>R</sup> ]	atzBC, trzN	Nd	Cette étude
<i>E. coli</i> Jm 109	Laboratoire	Compétente	lacZ, endA1, recA1, gyrA96	Nd	Promega®
XL1-Blue	Laboratoire	Compétente [Trc <sup>R</sup> ]	lacZ, recA1 endA1 gyrA96	Nd	Stratagene®
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Laboratoire	[Rif <sup>R</sup> ]	Curée (pTI)	0	(Devers et al., 2005)
<i>Rhizobium meliloti</i>	Laboratoire		Mégaplasmides (2)		Dangeard et al., 1926



**Figure B-1 : halo de dégradation résultant de la solubilisation de l'atrazine lié à l'activité dégradante microbienne dans un milieu gélosé. L'atrazine est présente dans ce milieu à une concentration supérieure à son seuil de solubilité formant un voile sur la gélose. Lorsque la dégradation est suffisante pour que la concentration soit inférieure à 33 mg L<sup>-1</sup> la gélose redevient translucide.**

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Souches

Les souches utilisées au cours cette étude, leur origine, ainsi que leurs caractéristiques cataboliques et génétiques ont été répertoriées dans le Tableau B-I.

### 2. Milieux de culture

La composition des milieux de culture utilisés durant cette étude est mentionnée en intégralité dans l'Annexe I. Pour cultiver les souches dégradantes tout en conservant leur potentiel génétique dégradant, le milieu minimum MS a été employé. En fonction des souches, celui-ci était supplémenté avec de l'acide cyanurique (MSAC) ou de l'atrazine (MSA) comme seule source d'azote. On considère en effet négligeable la source carbonée et azotée apportée par la thiamine et la biotine. En fonction des expériences, les concentrations en atrazine (99% ; Syngenta, Suisse) et en acide cyanurique (98% ; Sigma-Aldrich, France) dans les milieux variaient de 30 à 500 mg L<sup>-1</sup> et de 0,1 à 1 g L<sup>-1</sup>, respectivement. *Nb* : sur les milieux MSA solides dont la concentration en atrazine est supérieure au seuil de la solubilité, la croissance bactérienne produit un halo de dégradation (Figure B-1).

Le milieu riche TY a également été utilisé pour cultiver occasionnellement les souches dégradantes ainsi que *Agrobacterium tumefaciens* et *Rhizobium meliloti* 41. Celui-ci a été supplémenté ou non avec de la rifampicine (100 mg L<sup>-1</sup>), de la kanamycine (50 mg L<sup>-1</sup>), de la streptomycine (50 mg L<sup>-1</sup>) et/ ou de la spectinomycine (100 mg L<sup>-1</sup>).

Les souches d'*Escherichia coli* employées lors des clonages ont été cultivées en milieu SOC, ou en milieu LB contenant de l'ampicilline (100 mg L<sup>-1</sup>), de l'IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) 0,5 M, et/ou du X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) à raison de 50 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3. Expérience d'écologie évolutive *in vitro*

L'expérience évolutive menée sur *Pseudomonas* sp. ADP T-34 a consisté à cultiver de façon répétée cette souche dans du milieu MSA liquide contenant 100 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine (MSA<sub>100</sub>). Pour cela, la souche a été inoculée dans 100 mL de milieu MSA<sub>100</sub> et incubée à 28°C et 150 rpm. Afin de renouveler le milieu de culture, chaque semaine, 1 mL de la culture bactérienne était inoculé dans 100 mL de milieu MSA<sub>100</sub> neuf, et ré-incubé dans les mêmes conditions. A cette occasion, des prélèvements étaient effectués : (i) 1 mL était mélangé à 1 mL de glycérol (50%) et congelé à



-80°C afin de conserver la population, et (ii) 50 mL étaient congelés à -20°C afin d'extraire l'ADN. La culture a ainsi été répétée sur environ 1000 générations bactériennes.

#### 4. Cinétique de croissance

##### 4.1 En milieu TY

Les paramètres de croissance des populations microbiennes dégradant l'atrazine ou l'acide cyanurique ont été déterminés en milieu riche (TY) à l'aide d'un Bioscreen® (Labsystems Finlande). Pour ce faire, les souches ont été cultivées sur ce même milieu pendant une nuit à 28 °C sous agitation à 150 rpm (Infors-HT-Unitron®). La densité optique à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) des cultures bactériennes a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Biophotomètre, Eppendorf, France) et des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir des suspensions cellulaires présentant des  $DO_{600nm}$  de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ . Deux cents microlitres de chacune de ces dilutions ont alors été disposés dans une microplaque, à raison de 5 répétitions par dilution. La microplaque a été placée dans un Bioscreen® (Labsystems Finlande), un appareil qui a permis à la fois (i) d'incuber les cultures à température constante (28°C) et sous agitation (vitesse moyenne) et (ii) de mesurer automatiquement la  $DO_{600nm}$  des cultures toutes les 30 minutes.

##### 4.2 En milieu MSA ou MSAC

L'appareil utilisé pour collecter les données relatives à la croissance en milieu riche n'a pu être utilisé pour étudier la croissance en milieu minimum MS, l'acquisition des données (seuil de détection) étant impossible en deçà d'une turbidité égale à 0,2 ( $DO_{600nm}$ ), chiffre correspondant à la densité optique maximale obtenue pour ce type d'expérimentation.

La cinétique de croissance a donc été réalisée manuellement. La densité optique à 600 nm a tout d'abord été mesurée sur les précultures (Biophotometer-Eppendorf®) afin de quantifier la biomasse bactérienne et d'obtenir une quantité cellulaire identique pour les deux souches.

Pour chaque souche (ADP T34 ; ADP T100 ; ADPO, ADPE), trois flacons contenant 500 mL de milieu MSA ou MSAC ont été ensemencés avec une  $DO_{600nm}$  initiale de 0,002 UA (après dilution) et incubées à 28°C sous agitation à 150 rpm. Des aliquotes de culture (1 mL) ont alors été prélevés régulièrement afin de mesurer la  $DO_{600nm}$  à l'aide d'un spectrophotomètre (Biophotometer, Eppendorf, Allemagne).



## 5. Cinétique de dégradation et de minéralisation

### 5.1 Production de biomasse

Afin de produire suffisamment de biomasse microbienne pour réaliser les cinétiques de dégradation, les colonies ont été repiquées dans 10 mL de milieu liquide contenant 30 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine, correspondant à la limite de dissolution de l'atrazine en milieu aqueux.

Cette culture a été conduite dans des Erlenmeyers de 50 mL (agitation 150 rpm à 28°C) (Infors-HT-Unitron) jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0,3 et 0,6 selon les souches et vérifiée par spectrophotométrie (Biophotometer-Eppendorf®).

La vérification de l'activité dégradante a par ailleurs été confirmée par mesure HPLC. Pour les expériences de dégradation, les souches ont été cultivées dans 200 mL de milieu MSA ou MSAC jusqu'à obtenir une densité optique supérieure à 0,4 unités DO<sub>600nm</sub> en phase exponentielle de croissance. Puis les cellules ont été récupérées à l'aide d'une centrifugation à 6000 rpm pendant 5 min.

### 5.2 Analyse de la capacité de dégradation des populations bactériennes

#### 5.2.1 Atrazine

Les culots bactériens ont été lavés deux fois dans du tampon Knapp (6000 rpm, 5 min) puis repris dans 200 mL de Knapp contenant 30 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine et dilués pour atteindre 0,5 unité DO<sub>600nm</sub>. Les cultures microbiennes des populations T34 et T100 ont alors été incubées à 28°C et sous agitation 150 rpm (n=3). Un contrôle constitué de Knapp-Atrazine et exempt de bactéries a aussi été analysé. Des prélèvements ont régulièrement été effectués afin de mesurer par HPLC la quantité d'atrazine restante.

#### 5.2.2 Acide cyanurique

Afin de mesurer l'activité de dégradation de l'acide cyanurique des cultures, les membranes bactériennes ont été détruites pour relarguer les enzymes cytosoliques.

Après l'étape de centrifugation, le culot cellulaire a été transféré dans un tube Falcon® 15 mL complété de 2,2 g de billes de silice d'un diamètre de 22 µm. La rupture membranaire a été réalisée dans un appareil de lyse matricielle Fast-prep® Instrument (MP Biomedicals®, USA), utilisé à une vitesse de 6 m s<sup>-1</sup> pendant 30 s. Le broyat cellulaire ainsi obtenu a été re-suspendu dans une solution Knapp-acide cyanurique (500 mg L<sup>-1</sup>) à une DO<sub>600nm</sub> de 0,1 (n=3), incubé à 28°C, agité à 150 rpm. Des aliquotes ont régulièrement été prélevés pour être analysés par HPLC.



Figure B-2 : chaîne HPLC Varian (INRA Dijon). A: échantillonneur automatisé ; B: pompe; C: détecteur UV ; D: compteur à scintillation en flux continu ( $\beta$  flow-one) ; E : ordinateur de contrôle

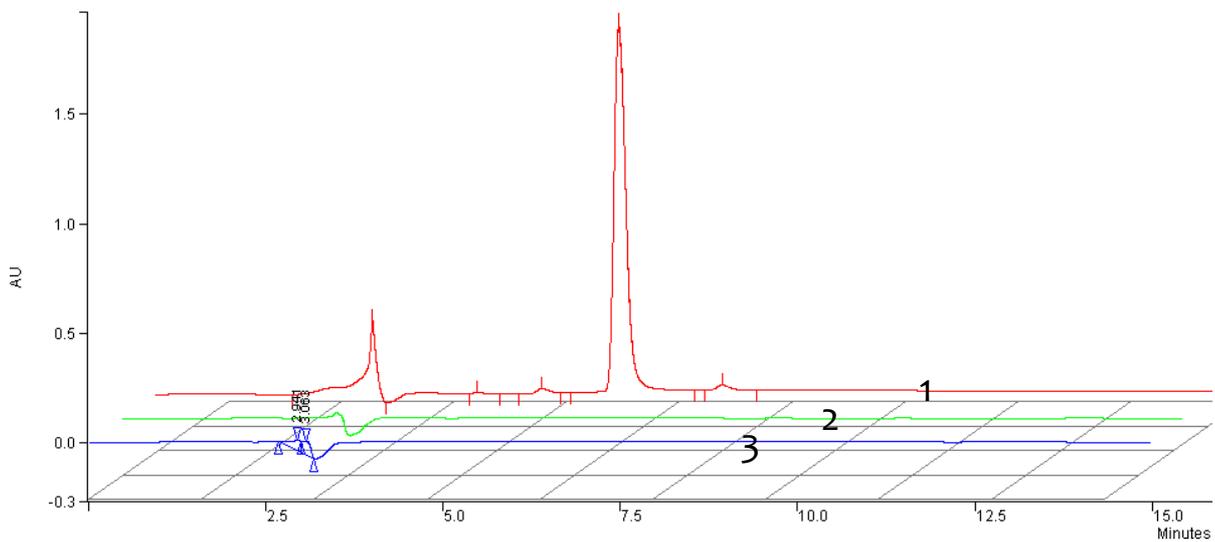


Figure B-3 : Profil chromatographique de l'atrazine.

1: milieu MSA contenant  $30 \text{ mg L}^{-1}$  d'atrazine (le premier pic correspond au milieu, le second à l'atrazine)

2 et 3: milieux après culture de bactéries dégradantes *Pseudomonas* sp. ADP ne présentant plus de trace d'atrazine.

### 5.3 Analyse de dégradation : HPLC

La capacité des souches à dégrader l'atrazine, ou tout autre métabolite pourvu d'un hétérocycle aromatique, a pu être évaluée par chromatographie liquide à haute performance (High-Pressure-Liquid-Chromatography). Le dosage consiste à mesurer la quantité d'atrazine restante dans le milieu à un temps  $t$ . La comparaison relative à la quantité initiale rend compte du pourcentage d'atrazine dégradée par la souche au cours du temps.

Afin d'établir une courbe de calibration et de déterminer un seuil de détection, des gammes de dilution d'atrazine et d'acide cyanurique ont été réalisées.

Pour évaluer la capacité des cultures à dégrader l'atrazine ou l'acide cyanurique, 1 mL de culture bactérienne a été filtré à  $0,2 \mu\text{m}$  et analysé par HPLC (Figure B-2). La chromatographie a été réalisée à l'aide d'une colonne Microsorb-MV C18 (longueur 25 cm, diamètre interne 4,6 mm, Varian®) et d'une phase mobile constituée de méthanol et d'eau (75/25; v/v) et délivrée en mode isocratique à raison d'  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . La détection de l'atrazine et de l'acide cyanurique a été réalisée à 220 nm après un temps de rétention respectivement d'environ 6,9 et 3,5 min (Figure B-3).

### 5.4 Cinétique de minéralisation

La cinétique de minéralisation de l'atrazine a également pu être appréhendée par radiorespirométrie, en incubant les cellules bactériennes avec de l'atrazine marquée uniformément au  $^{14}\text{C}$  sur le cycle *s*-triazinique et en suivant au cours du temps l'apparition de  $^{14}\text{CO}_2$  relatif à sa minéralisation.

Après lavage, la biomasse bactérienne a été remise en suspension dans un milieu Knapp-atrazine ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ). Puis 10 mL de suspension cellulaire ( $\text{DO}_{600\text{nm}} 0,05$ ) ont été additionnés de 20000 désintégrations par minute (dpm) d'atrazine dont le cycle était marqué avec un isotope  $^{14}\text{C}$  (Activité spécifique  $910 \text{ millibecquerel mmol}^{-1}$  (mbq)). Les échantillons ont alors été placés dans les radiorespiromètres pour y être incubés à  $28^\circ\text{C}$  et sous agitation (150 rpm). Le radiorespiromètre est un bocal en verre fermé hermétiquement dans lequel est placée la suspension bactérienne ainsi qu'une fiole contenant 5 mL de soude (0,2 N) permettant de piéger le  $^{14}\text{CO}_2$  émis lors de la minéralisation de l'atrazine. Le piège à soude a été régulièrement changé et la quantité de  $^{14}\text{C}$  présent dans le piège a été dosée par un compteur à scintillation (Packard 1900TR-Tricarb) après l'ajout de 10 mL de liquide scintillant (ACSII, Amersham).



## 6. Méthodes d'extraction des acides nucléiques

A partir de cultures bactériennes, plusieurs méthodes d'extraction d'ADN ont été utilisées, et ce, en fonction de la quantité, de la qualité désirées et/ou de la nature de l'ADN (total ou plasmidique).

### 6.1 Pré-traitement PCR

Afin d'amplifier l'ADN par PCR, les cellules bactériennes ont subi un traitement de lyse couplant protéinase K et chocs thermiques selon la méthode décrite par Cheneby *et al.* (2001).

### 6.2 Extraction de l'ADN génomique de haute qualité

Afin de réaliser des Southern blots ou des PCR longues, l'ADN génomique des souches a été extrait. Pour cela, un aliquote de 20 mL de culture bactérienne a été centrifugé 6 min à 6000 rpm afin de collecter les cellules. L'ADN a été extrait du culot bactérien à l'aide du kit Midiprep (Qiagen®) selon les informations délivrées par le fabricant. La quantité (A260 nm) et la qualité (A260/A280 et A260/A230) de l'ADN extrait ont été mesurées au spectrophotomètre (Biophotometer, Eppendorf, Allemagne).

### 6.3 Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique a été réalisée à partir d'un volume de 1,5 mL de culture bactérienne *via* l'utilisation d'un kit Qiaprep Spin miniprep (Qiagen®, France). A l'issue de l'extraction, la quantité et la qualité de l'ADN plasmidique extrait ont été déterminées par spectrophotométrie (Biophotometer, Eppendorf, Allemagne).

## 7. Amplifications génétiques

### 7.1 Polymérisation en chaîne (PCR)

L'analyse du potentiel génétique dégradant des souches ainsi que l'obtention d'amplicons pour le clonage ont été effectuées par PCR en ciblant les gènes de dégradation *atzA, B, C, D, E, F, trzD* et *trzN*.

#### 7.1.1 Amplification

Les réactions PCR ont été menées dans un volume final de 25 µL comprenant 2,5 µL de matrice ADN, 0,2 M de dNTP, 1 µM de chacune des deux amorces oligonucléotidiques (Cf Annexe II), et 1,25 U de Taq DNA polymérase (Q-biogene®). La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Eppendorf®-Personal Mastercycler) selon les conditions suivantes : 5 min à 95°C, 35 cycles de [1 min à 94°C, 1 min à la température d'hybridation spécifique à chaque couple



d'amorces oligonucléotidiques (Cf Annexe II) et 2 min à 72°C], suivis d'un cycle additionnel de 10 min à 72°C. Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse.

Afin d'amplifier la totalité du gène *atzA*, de nouvelles amorces (*atzA\_FC*) flanquant la *quasi*-totalité du cadre de lecture ont été dessinées (Cf Annexe II). En effet, 41 pb n'ont pu être incluses à l'extrémité 5' ainsi que 17 pb en 3', correspondant de fait à un déficit de 14 résidus amino-acyles à l'extrémité N-terminal et 4 en C-terminal de l'atrazine chlorohydrolase.

Ce choix a été fait en raison de l'incompatibilité du couple d'amorces encadrant la totalité du gène, et ce lié à une forte inégalité des températures d'hybridation. Afin de pallier les erreurs de polymérisation durant l'amplification, pour chaque souche, la PCR a été effectuée 4 fois, les amplifiats obtenus ont été clonés et séquencés individuellement.

### 7.1.2 Electrophorèse

Les produits PCR, de digestion et les extraits plasmidiques ont de façon systématique été mélangés à un tampon de charge coloré avec le bleu de bromophénol ou le xylène-cyanol (Eurobio®).

Une fois la concentration du gel d'agarose choisie, et celui-ci polymérisé dans la cuve (Embi Tec®), le gel a été immergé dans une solution tampon Tris-Borate-EDTA-Solution standard 1X (Borate 8,9 mM ; EDTA 2,2 mM) (Sigma-Aldrich, France).

Les échantillons ont été chargés ainsi que des marqueurs de tailles moléculaires sélectionnés en fonction de la concentration du gel, de la taille du fragment à analyser (DNA molecular weight marker II, Roche Applied Science®, France ; 1 kb ladder, 100 bp ladder, Invitrogen®). La migration a été effectuée dans une cuve électrophorétique soumise à un voltage compris entre 40 et 100 V à ampérage constant.

### 7.1.3 Révélation

A l'issue de la migration, le gel d'agarose a été plongé environ 10 min dans un bain de bromure d'éthidium ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Gibco-BRL, life technologies), rincé à l'eau quelques minutes, révélé sur un transilluminateur UV (Wilber Lourmatt®) et enfin photographié (CDD camera, Sony®, France).

## 7.2 PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)

La PCR-RFLP permet de révéler le polymorphisme de séquences de fragments amplifiés par PCR. L'opération consiste (i) à amplifier une séquence d'ADN à l'aide de couple d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, (ii) à la digérer avec des enzymes de restriction et (iii) à analyser le



polymorphisme de restriction après séparation électrophorétique. Le gène cible souvent choisi pour conduire cette expérience est l'ADNr 16S (ADN codant pour la sous-unité 16S du ribosome) ; on parle alors d'ARDRA pour Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. Ce gène, utilisé comme « horloge moléculaire », permet de distinguer différentes souches bactériennes au niveau de l'espèce. Les enzymes de restriction peuvent être choisies en fonction des occurrences de coupure sur un fragment, ce paramètre étant lié à la taille de la séquence reconnue par l'enzyme.

Après amplification, 5 µL des produits PCR-16S obtenus ont été digérés avec 5 U d'enzyme de restriction *AbaI* ou *RsaI*, 2,5 µL de tampon 10X spécifique de l'enzyme (Appligene-Oncor®, France) et de l'eau (qsp 25 µL), pendant une nuit à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% (gel haute résolution (Invitrogen, France)). A noter que l'efficacité de la séparation des petits fragments est d'autant plus grande que la concentration en agarose est élevée.

### 7.3 Longue PCR

La PCR classique ne permet pas d'amplifier de manière aisée des fragments d'ADN supérieurs à 2 kb. La longue PCR est optimisée pour amplifier des fragments de grandes tailles.

- Les composants de cette PCR sont donc différents par : l'utilisation conjointe de deux polymérases : une ADN polymérase et une Taq-polymérase thermorésistante dotée d'une activité « proof-reading ».
- La présence dans le milieu réactionnel d'adjuvants, tels que le glycérol, le KCl, le dithiothreitol ; certains permettent de diminuer la température de fusion de l'ADN cible et de fait la durée de dénaturation inhérente à ce dernier paramètre.

D'un point de vue méthodologique, il est nécessaire de :

- travailler avec de l'ADN de très bonne qualité ;
- Augmenter la durée d'élongation ;
- Travailler à une température d'hybridation plus élevée (68-70°C) donc les amorces utilisées en PCR longue sont généralement plus longues (Ameziane *et al.*, 2006).

La réaction de PCR longue a été réalisée à l'aide du kit Long Expand PCR (Roche, France). Le mélange réactionnel était constitué de 500 ng d'ADN, 3,75 U d'ADN polymérases, 2 mM de dNTP, 0,3 µM de chaque amorce (26943F et *trbNr* ; séquences en Annexe II), 5 µL de Tampon 3 (10X) et d'eau ultra pure (qsp 50 µL).



L'amplification a été conduite dans un thermocycleur (PTC gradient, MJ research, Waltham®, USA). Elle a consisté en une étape de 2 min à 94°C, 10 cycles d'amplification de 10 sec à 94°C, 30 sec à la température optimale d'appariement des amorces et 12 min à 68°C, puis 20 cycles d'amplification pour lequel le temps d'élongation a été incrémenté de 20 sec par cycle et d'une étape finale de 7 min à 68°C.

A l'issue de cette amplification, les produits PCR ont été immédiatement purifiés par précipitation iso-alcoolique. Pour cela, ils ont été additionnés d'un volume d'isopropanol froid et d'1 µL de glycogène puis incubés 20 min à -20°C. Ils ont ensuite été centrifugés à 13000 rpm à 4°C pendant 30 min. Les culots d'ADN ont par la suite été rincés deux fois à l'éthanol 70% froid, séchés à température ambiante et repris dans 50 µL d'eau ultra pure stérile.

## 8. Profils plasmidiques

### 8.1 Plasmide Eckhardt

En 1978, Thomas Eckhardt publie un protocole d'extraction et de séparation électrophorétique de plasmides, protocole ensuite modifié par Wheatcroft.

Le principe de cette méthode repose sur une lyse douce des cellules par l'action (i) du lysozyme, qui hydrolyse les glycoaminoglycanes de la paroi bactérienne (ii) et du N-lauroylsarcosinate [C.A.S : 137-16-6], détergent anionique responsable de la solubilisation des protéines et glycoprotéines de la membrane plasmique. L'action du Ficoll, de par ses propriétés de polysaccharide hydrophile, va permettre la séparation moléculaire selon un gradient de densité. Le Sodium Dodecyl Sulfate, en temps que détergent, va hydrolyser les liaisons covalentes des protéines (retour à la structure primaire) de la membrane plasmidique permettant sa lyse.

L'extraction a été conduite à partir de 1 mL de culture bactérienne présentant une  $DO_{600nm}$  de 0,2 UA. Après centrifugation (15000 g, 3 min, 4°C), le culot a été remis en suspension dans 500 µL d'eau ultra pure à 4°C. La suspension bactérienne a été recouverte de 1 mL de N-Lauroyl-Sarcosinate (0,3%), puis centrifugée à nouveau (3 min, 5000 g, 4°C). Une fois le surnageant éliminé, le culot a été remis en suspension dans 40 µL de Ficoll (20%), puis incubé 15 min dans la glace. Simultanément, 25 µL de SDS 20% supplémentés de xylène-cyanol ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 0,75% puis ont été soumis pendant 15 min à un courant de 100V dans le sens inverse de la migration de sorte que le mélange se place à 1 cm des puits en amont du gel. Les suspensions bactériennes ont alors été mélangées avec 10 µL d'agent de lyse (RNase 0,4 g L<sup>-1</sup>; lysozyme 1 g L<sup>-1</sup>, rouge de bromophénol 1 g L<sup>-1</sup>) et 25 µL de ce mélange ont été



déposés dans les puits du gel. Ils ont été soumis à une migration à 40 V pendant 30 min puis à 100 V pendant 4 h. Comme marqueur de taille plasmidique, 2 souches bactériennes possédant des plasmides de tailles connues ont été incluses dans l'expérience : (i) *Agrobacterium tumefaciens* C58 qui porte les plasmides pAT (543 kb, numéro d'accèsion AE007872) et pTi (214 kb, numéro d'accèsion AE007871), et (ii) *Rhizobium meliloti* 41 qui porte un gros plasmide (41,5 kb), pRme41 : Tn7 (236 kb) et pRP4 (60 kb, numéro d'accèsion L27758) (Devers *et al.* 2007).

À l'issue de la migration, le profil plasmidique a été révélé sous UV après coloration du gel au BET selon la procédure standard.

## 8.2 Electrophorèse en champ pulsé

La résolution de la séparation des plasmides sur un gel d'agarose par la méthode Eckhardt est faible et ne permet pas de distinguer de moindres différences dans des poids moléculaires élevés.

En effet, étant donné que l'échelle de taille maximale dont nous disposons est de 23 kb et que le profil de migration de l'ADN sur le gel suit une répartition semi-logarithmique (à savoir que les fragments les plus courts sont séparés de façon beaucoup plus résolutive que les grands), l'estimation de la taille exacte des gros fragments est impossible.

La PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), méthode mise au point en 1984 par Schwartz et Cantor, emprunte son principe à l'observation suivante : sous l'effet d'un champ électrique dirigé, la molécule d'ADN va subir une modification de conformation et d'orientation.

Cette modification de l'encombrement stérique et de l'orientation de la migration des molécules d'ADN va permettre de s'affranchir du problème de résolution de l'électrophorèse classique puisque le maillage constitué par l'agarose agit tel un filtre qui ralentira la migration des fragments d'ADN. Ainsi, afin de recréer des conditions analogues d'étirement dans un gel électrophorétique, des champs électriques, orientés alternativement perpendiculairement et parallèlement, sont appliqués dans la cuve et l'orientation de la molécule permettra son passage entre les mailles.

### 8.2.1 Préparation des inserts et lyse bactérienne

Afin de produire la biomasse nécessaire à la réalisation de la PFGE, 100 µL de culture liquide des souches de *Pseudomonas* ont été étalés à l'aide de billes sur du milieu MSA solide et incubés à 28°C pendant une semaine. Le tapis bactérien formé a été re-suspendu dans 1 mL de Tris 10 mM-NaCl 1 M et centrifugé à 14000 rpm pendant 5 minutes. Le culot bactérien a alors été lavé deux fois



dans les mêmes conditions, puis le culot obtenu a été re-suspendu dans ce même tampon afin d'obtenir une  $DO_{600nm}$  de 1,5 UA.

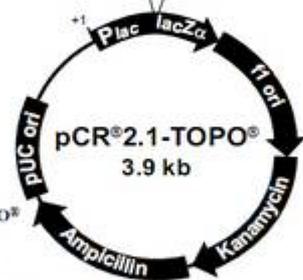
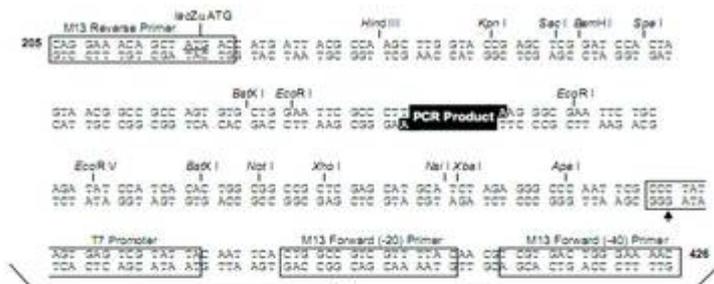
Cette suspension a été incubée à 60°C pendant 30 minutes, puis 500 µL ont été homogénéisés avec 500 µL de gélose à bas point de fusion (See Plake GTG, Tébu, France) 1% préparée dans du Tris 10 mM- NaCl 1 M et maintenue à 60°C. Des inserts ont alors été réalisés pour chaque souche en déposant 80 µL du mélange dans chaque puits d'une barrette à inserts. Après refroidissement à 4°C, les inserts de chaque souche ont été démoulés et équilibrés dans 3 mL d'EDTA 0,5 M pH 8 pendant une heure, à 37°C. A l'issue de cet équilibrage, la lyse a été effectuée dans une solution d'EDTA 0,5 M pH 8 contenant du SDS (1%) et de la protéinase K (1 mg mL<sup>-1</sup>) pendant 2 jours à 56°C. La lyse bactérienne a finalement été stoppée en lavant 2 fois les inserts dans 20 mL de tampon TE (Tris 10 mM- EDTA 0,1 mM) contenant 3,5 mg de phénylméthylsulfonyl fluorure (PMSF) à 37°C pendant une heure, puis le PMSF a été éliminé en lavant 3 fois les inserts dans 20 mL de TE pendant une heure, à 37°C.

#### 8.2.2 Traitement des inserts

Une fois les inserts préparés, ils ont été digérés soit par l'enzyme *XbaI* (Promega, France) pour générer des profils de restriction génomique, soit par la nucléase S1 (Promega, France) pour générer des profils plasmidiques. Dans les deux cas, un insert a été incubé dans 200 µL de tampon fourni avec l'enzyme pendant 30 minutes à température ambiante, puis, 40 U d'enzyme *XbaI* ou 3 U de nucléase S1 ont été ajoutées. L'ensemble a été incubé une nuit à 4°C pour que l'enzyme diffuse dans l'insert. La digestion par *XbaI* a été réalisée pendant 5 heures à 37°C, puis les inserts ont été conservés à 4°C. La digestion par la nucléase S1 a été réalisée pendant 45 minutes à 37°C ; elle a été stoppée en remplaçant le milieu réactionnelle par 200 µL d'EDTA 0,5 M pH 8 pendant 10 minutes. Enfin les inserts ont été conservés à 4°C dans du TE.

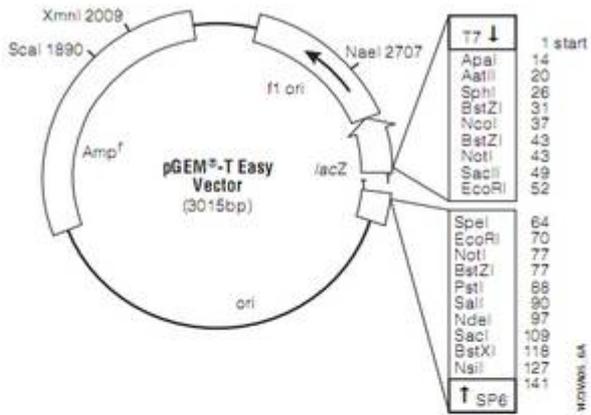
#### 8.2.3 Electrophorèse

L'électrophorèse en champs pulsé a été réalisée à l'aide du système CHEF-DR II (Bio-Rad, France). Les inserts ont été déposés dans un gel agarose 1% (MPBio, France) préparé dans du TBE 0,5 X (Sigma-Aldrich, Allemagne) et le gel a été recouvert de TBE 0,5 X. Les conditions de migration ont été les suivantes : temps initial de pulse : 20 secondes, temps final de pulse : 5 secondes, ampérage : 123 mA ; durée de migration 20 heures. Lors de la migration, le système a été réfrigéré à 14°C. A l'issue de la migration, le gel a été coloré pendant 1 heure à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium (200 µg L<sup>-1</sup>), lavé 30 minutes dans de l'eau et photographié sous UV.



Comments for pCR®2.1-TOPO®  
3908 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-571
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- M13 Forward (-40) priming site: bases 411-426
- f1 origin: bases 548-962
- Kanamycin resistance ORF: bases 1296-2090
- Ampicillin resistance ORF: bases 2108-2968
- pUC origin: bases 3113-3786



**pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:**

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
lacZ start codon	180
lac operator	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
lac operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

Figure B-4: carte des vecteurs de clonage pCR ®2.1 TOPO et pGEM-T Easy (Invitrogen®, Promega®).

## 9. Clonage et séquençage des amplicons

### 9.1 Purification

Les amplicons de la taille escomptée ont été purifiés à partir du gel d'électrophorèse. Pour ce faire, le morceau d'agarose contenant le fragment souhaité a été découpé et l'ADN extrait à l'aide du Kit Minelute Qiagen (QIAGEN®, France) selon les indications du fabricant. L'intégrité des fragments d'ADN purifiés a été vérifiée par séparation électrophorétique sur un gel d'agarose à 1%.

### 9.2 Ligation

La ligation a été réalisée dans le vecteur TOPO TA Cloning PCR 2.1 (Invitrogen®) ou pGemT-Easy (Promega®) (Figure B-4) en mélangeant 4  $\mu\text{L}$  d'amplicon purifié à 1  $\mu\text{L}$  de vecteur (et 1  $\mu\text{L}$  de ligase concernant le vecteur pGEMT). Les vecteurs employés ici portent, d'une part, le gène de résistance à l'ampicilline et, d'autre part, celui de la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) qui contient un site d'insertion caractérisé pour ses propriétés de polyclonage. Ces différentes caractéristiques permettent une discrimination rapide et efficace des clones recombinants sur la base de la résistance à l'ampicilline et sur la base d'un criblage blanc/bleu résultant de l'oxydation du substrat chromogène, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside. En effet, seules les bactéries contenant le vecteur sont capables de se développer sur le milieu additionné d'ampicilline. Puis, 100  $\mu\text{l}$  de bactéries chimio-compétentes *E. coli* XL1-blue ou JM109 ont été transformés avec 6  $\mu\text{l}$  de produit de ligation. La réaction de transformation a été conduite 10 min à 4°C, suivie d'un choc thermique à 42°C pendant 30 s. Les bactéries ont ensuite été replacées 5 min à 4°C, puis 500  $\mu\text{l}$  de milieu SOC ont été ajoutés. Les bactéries ont ensuite été incubées 30 min à 37°C sous agitation avant étalement sur boîtes de Pétri (Gélose Luria-Bertani additionnée d'Ampicilline 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , d'IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside) 0,5 M et de X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Les boîtes sont alors placées pendant 12 h à 37°C.

L'IPTG est l'inducteur du gène de la  $\beta$ -gal et l'X-Gal est le substrat chromogène de cette enzyme. Si le gène  $\beta$ -gal est intact, les colonies bactériennes seront bleues alors que celles contenant l'insert n'exprimeront pas une  $\beta$ -gal fonctionnelle et resteront blanches.

Il est toutefois possible d'obtenir des faux négatifs (c'est-à-dire des bactéries bleues contenant des inserts) lorsque que la taille du fragment inséré est trop faible et/ou en phase avec le cadre de lecture. Afin d'éviter les faux-positifs, les clones blancs ont été repiqués sur boîtes LB/Amp/IPTG/X-Gal neuves à fonds numérotés en striant la gélose à l'aide d'une oese et



incubés à 37°C toute la nuit afin de s'assurer de l'efficacité de la ligation et de la transformation (une colonie bleue a été repiquée en parallèle afin de constituer un contrôle).

### 9.3 Criblage des clones recombinants

Pour cribler les clones recombinants, 10 colonies ont été cultivées dans 2 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline  $(100 \mu\text{g mL})^{-1}$  à 37°C sous agitation pendant 24 h. Les plasmides recombinants ont été extraits à partir d'un volume de 1,5 mL de culture *via* l'utilisation d'un Kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen®, France). La concentration en ADN plasmidique a été dosée à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Biophotometer Eppendorf®).

Le criblage des bactéries recombinantes a pu être effectué de deux façons distinctes.

D'une part, par une digestion des plasmides extraits. En effet, il existe deux sites de restriction uniques de part et d'autre du polylinker. La première étape consiste à incuber une nuit à 37°C 2  $\mu\text{l}$  de plasmide avec 1  $\mu\text{l}$  de tampon 10X, 6,5  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  et 10 U d'enzyme *EcoRI* (Qbiogene®, USA). Le produit de digestion est alors déposé sur un gel d'agarose à 1% afin de contrôler la taille de l'insert (auquel il faudra retrancher la partie appartenant au polylinker).

La seconde méthode consiste à effectuer une PCR classique (sur les colonies simplement piquées) à l'aide d'une oese en utilisant les amorces M13 sens et antisens, ou Sp6 et T7 (Annexe II) en suivant le programme d'amplification suivant : 4 min à 95°C, puis 35 cycles comprenant 45 sec à 94°C ; 45 sec à 55°C et 1,5 min à 72°C et finalement une élongation de 7 min à 72°C.

### 9.4 Séquençage

Les amplicons ont été séquencés en utilisant les amorces présentes de part et d'autres du site d'insertion du vecteur dans le polylinker (amorces M13 et M13 REV pour le vecteur TOPO et SP6 et T7 pour le vecteur pGEMT) selon la méthode mise au point par Sanger en 1977 (Sanger *et al.*, 1977) (Beckman Coulter Genomics®/www.beckmangenomics.com).

Le séquençage permet de s'assurer de la bonne insertion des gènes clonés, de préciser les réarrangements génétiques et permet également l'étude bioinformatique des séquences à des fins comparatives.

## 10. Southern Blot

### 10.1 Digestion

L'ADN<sub>g</sub> a été digéré avec des enzymes de restriction, dont le site de restriction hexanucléotidique est rare. La réaction a été conduite dans un volume de 40  $\mu\text{L}$  contenant 200 ng d'ADN, 20 U

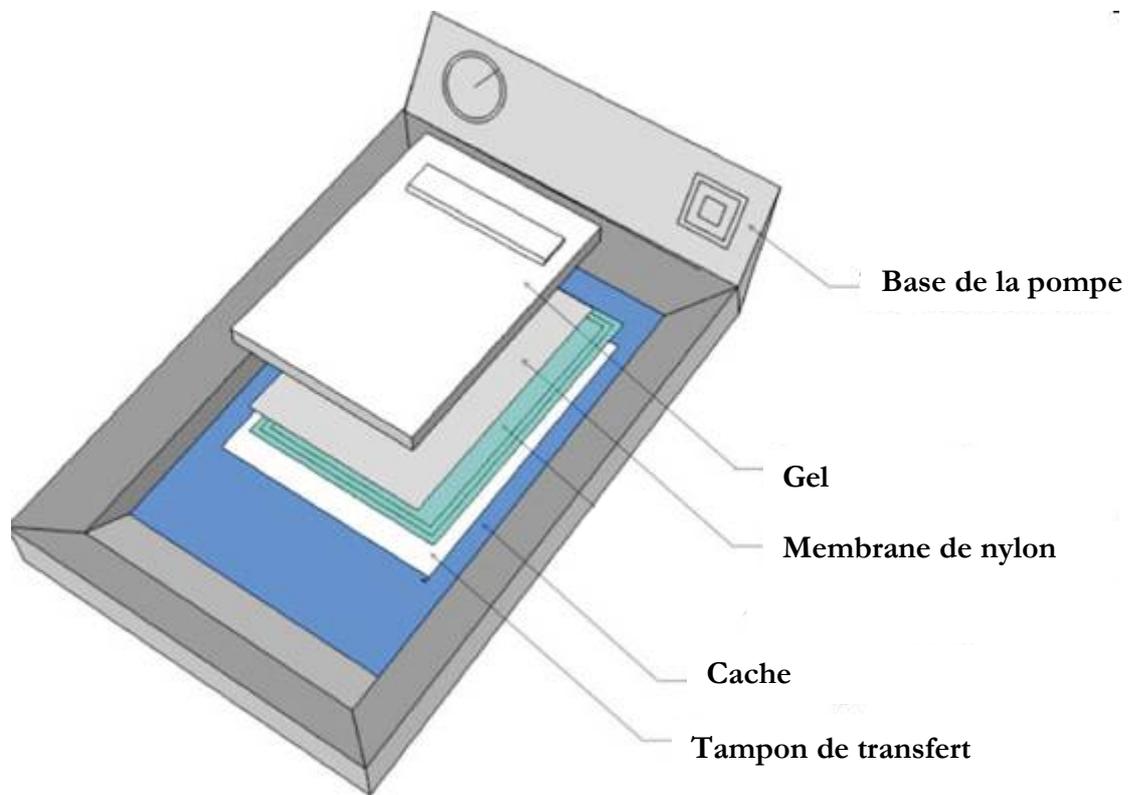


Figure B-5 : schéma du matériel de transfert des acides nucléiques d'un gel d'agarose sur une membrane de nylon pour hybridation en Southern Blot.

d'enzyme *NruI* ou *SmaI* (Qbiogene®, USA) associée à leur tampon respectif 1X, et incubée une nuit à 37°C. Vingt microlitres de produit de digestion ont été déposés sur un gel d'agarose à 0,9% et séparés électrophorétiquement à 40 V pendant une nuit. Ont également été déposés sur le gel 5 µL d'un marqueur de taille moléculaire marqué à la digoxigénine (DNA molecular weight marker II Dig-labeled, Roche Applied Science®, France).

#### 10.2 Transfert de l'ADN digéré sur membrane de nylon

Les ADN digérés ou les profils plasmidiques séparés par électrophorèse ont été transférés sous vide sur des membranes de nylon (Nytran N-0.45 µm -Whatman®).

Pour ce faire, les ADN présents dans les gels ont subi une première étape de dépurination (hydrolyse de la liaison N-glycosidique, substituant les bases puriques par un radical hydroxyle) par imprégnation du gel dans une solution d'HCl à 0,25 N (2x15 min) en agitation douce. L'efficacité de cette étape est confirmée par la réaction acido-basique entraînant le changement de couleur du bleu de bromophénol. Cette étape permet d'augmenter l'efficacité du transfert des fragments de taille supérieure à 10 kb en éliminant des résidus adénine ou guanine du squelette pentose-phosphate. Cette dépurination va générer des ruptures dans le fragment, améliorant, de fait, leur transfert vers la membrane. A l'issue de cette étape, le gel est rincé dans de l'eau utrapure et plongé dans un tampon de dénaturation (0,4 N NaOH ; 0,6 N NaCl) et sous agitation légère.

L'étape de dénaturation est fondamentale puisqu'elle permet l'obtention de brins monocaténares, d'ADN pouvant se lier de façon covalente à la membrane et être reconnus par la sonde nucléotidique.

La membrane (11x14 cm) (pré-incubée dans le tampon de dénaturation) et le gel sont ensuite placés sur la pompe à vide selon le schéma présenté en Figure B- 5.

Le vide est appliqué pendant une durée de 2 h et des ajouts de tampon de dénaturation effectués toutes les 15 min. Après cette étape, la membrane est lavée à 2 reprises dans du SSC 5X (Saline Standard Citrate ; NaCl 0,75 M ; Trisodium citrate  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0,047 M ; pH7 ajusté au HCl) pendant 5 min. Cette étape permet de neutraliser la membrane.

La fixation covalente des fragments d'ADN monocaténares à la membrane de nylon a été effectuée par une exposition aux UV (254 nm) pendant 3 minutes (Wilber Lourmatt®) et par incubation à 80°C pendant une heure. La liaison covalente de l'ADN à la membrane de nylon résulte de l'interaction des résidus thymidiques de l'ADN avec les groupements amines chargés positivement de la membrane.

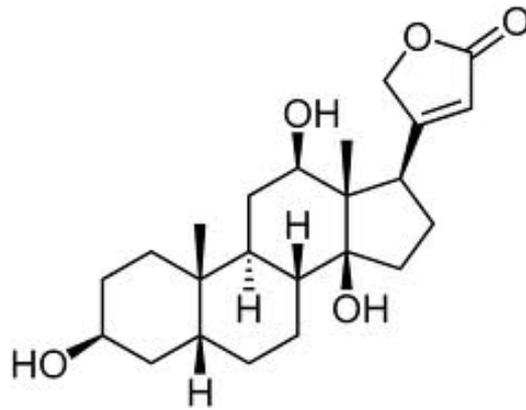


Figure B- 6 : structure chimique de la 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-tétradécahydrocyclopenta[a]phénanthrén-17-yl]-2H-furan-5-one (Digoxigénine, Roche®).

### 10.3 Préparation des sondes

Les sondes sont obtenues par PCR, réalisées avec des nucléotides marqués à la digoxygénine (dUTP-DIG) (Roche®, Biochemical). La digoxygénine est un haptène stéroïdien de faible poids moléculaire, présent dans les inflorescences de certaines espèces de digitale (*Digitalis purpurea* et *Digitalis lanata*) (Lion et Haas, 1990). La caractéristique de ces molécules est de pouvoir interagir, d'une part, avec les acides nucléiques (Figure B-6) et d'autre part avec des anticorps. L'incorporation du dUTP-DIG dans la sonde est ensuite vérifiée sur gel par comparaison avec un amplicon généré avec un mélange de dNTP classique.

### 10.4 Hybridation

La pré-hybridation de la membrane a été effectuée à 65°C pendant 2 h dans 20 mL de solution de pré-hybridation préchauffée à 65°C (5X SSC, 1% agent bloquant, 0,1% N-laurylsarcosinate, 0,02% SDS) en vue de saturer les sites de fixation non spécifiques. L'hybridation *sensu stricto* a été effectuée de la façon suivante : 10 µL des sondes ciblant les gènes d'intérêt ont été dénaturés thermiquement par une incubation de 10 min à 100°C puis ajoutés à 20 mL de tampon de pré-hybridation. Le degré de spécificité de cette étape est conditionné par la stringence de la solution d'hybridation ainsi que celle des tampons de lavage successifs utilisés ultérieurement jusqu'à la révélation.

À l'issue de l'hybridation, la membrane a été rincée 2 x 5 min dans 100 mL d'un tampon de lavage (2X SSC ; 0,1% SDS) à température ambiante, puis équilibrée 2 x 15 min dans un tampon contenant 0,1X de SSC et 0,1% de SDS à 68°C. Puis la membrane a été à nouveau lavée 1 min dans un troisième tampon de lavage (Tris-HCl 100 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7,5) pour être finalement incubée pendant 30 min dans un tampon froid (Tris-HCl 100 mM et NaCl 150 mM, pH 7,5) contenant 1% d'agent bloquant à température ambiante.

Puis la membrane a été incubée 30 min à température ambiante dans une solution d'anticorps anti-digoxygénine (Roche®) couplé à une phosphatase alcaline, dilué au 1/50000 (Tris-HCl 100 mM ; NaCl 150 mM, pH 7,5) et 1% d'agent bloquant. La membrane a ensuite été rincée 2x15min dans une solution composée de Tris-HCl 100 mM et NaCl 150 mM (pH 7,5) et de 0,3% de Tween20 avant d'être lavée 5 min à deux reprises dans l'ultime tampon de lavage (Tris-HCl 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH 9,5).

Afin de révéler par chimioluminescence la détection immunologique de la sonde hybridée sur l'ADN, la membrane a été incubée à l'obscurité 5 min dans 10 mL du précédent tampon filtré à



0,2 µm et supplémenté de 50 µL de CPD-Star<sup>TM</sup> (RocheBiochemical®, Allemagne). Cette molécule constitue le substrat chromogène de la phosphatase alcaline (Edwards *et al.*, 1994).

La réaction catalysée par la phosphatase alcaline consiste en une déphosphorylation du C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>7</sub>PNa<sub>2</sub> (CPD-Star<sup>TM</sup>) entraînant la formation d'un composé anionique métastable (c'est-à-dire cinétiquement stable mais pas thermodynamiquement) qui va évoluer vers la rupture du cycle dioxetane entraînant la production d'énergie et l'émission de lumière (Hummelen *et al.*, 1987). Les membranes sont ensuite séchées à l'aide de papier Whatman® et scellées dans des films plastiques transparents. Les membranes ainsi conditionnées ont alors immédiatement été mises en contact avec des films autoradiographiques dans une cassette (Kodak®) pendant une durée allant de quelques minutes à une nuit selon la qualité de l'ADN à révéler.

Les films photographiques ont enfin été développés *via* trois bains successifs (3 min dans un bain de révélateur, 5 min dans un de fixateur suivi d'un rinçage à l'eau).

### 10.5 Déshybridation

Il nous a été possible d'utiliser les membranes à plusieurs reprises avec de nouvelles sondes en procédant à leur déshybridation. Cette procédure consiste à éliminer les sondes fixées sur l'ADN lié de façon covalente à la membrane de nylon. Pour ce faire, les membranes ont été lavées dans de l'eau ultra pure à température ambiante puis à deux reprises durant 20 min à 37°C dans une solution de déshybridation (NaOH 0,2 N ; SDS 0,1 N). Le principe est identique à celui utilisé pour dénaturer l'ADN du gel durant l'étape de transfert, à savoir que la présence d'une solution de soude engendre la séparation des brins d'ADN et donc la séparation du dimère ADN-sonde. Le pH membranaire est ensuite équilibré *via* 2 bains successifs dans du SSC (2X), puis les membranes sont séchées et conservées à 4°C dans du papier Wathman.

## 11. Surexpression protéique

### 11.1 Principe

Les vecteurs de surexpression sont caractérisés par la présence d'un promoteur T7 (fixant la T7 polymérase) permettant la surexpression des gènes en aval de ce dernier dont la séquence en acides nucléiques a été introduite dans le polylinker.

Les vecteurs de surexpression permettent la production d'une grande quantité de protéines lorsqu'ils sont induits. Pour ce faire, ce plasmide contient plusieurs éléments clefs : un gène *lacI* codant pour la protéine de répression du gène *lac*, un promoteur T7 spécifique de l'ARN polymérase T7 (ne fonctionnant pas avec l'ARN polymérase bactérienne) et un polylinker

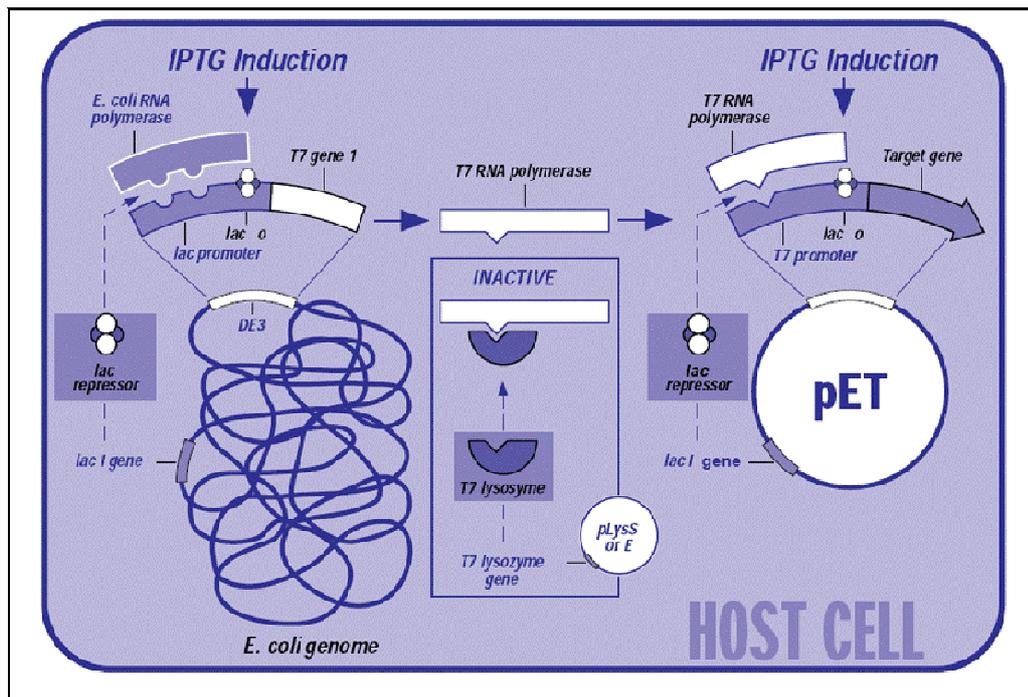


Figure B-7 : représentation schématique de l'induction par l'IPTG de la production protéique bactérienne *in vivo*.

contenant de nombreux sites de restriction, une origine de réplication Orf et un gène de résistance à l'ampicilline (Blaber, 1998).

Le promoteur T7 ainsi que l'opérateur *lac* sont tous deux situés en amont du site de polyclonage. Lorsque l'ARN T7 polymérase est présente, et si l'opéron *lac* n'est pas réprimé, la transcription du gène inséré est effectuée. En raison de l'origine virale du promoteur, la transcription est rapide et intensive, et ce, pendant toute la période durant laquelle la polymérase T7 est synthétisée (Campbell, 2003).

Ce vecteur est alors transféré dans des bactéries de transition (Novablue) ne possédant pas la capacité de surexprimer la protéine (en effet, elles ne synthétisent pas la T7-polymérase mais présentent une efficacité de transformation plus importante que les bactéries BL21).

Après avoir extrait le vecteur des bactéries transformées à l'aide d'une extraction plasmidique, la vérification du sens d'insertion du gène peut être effectuée. Les bactéries utilisées pour la surexpression, en l'occurrence des *Escherichia coli* BL21 (DE3) ont été préalablement transformées pour transcrire de façon non constitutive le gène de la T7 polymérase. En effet, en présence d'IPTG, la répression effectuée sur le promoteur par l'opérateur *lacI* est levée et la transcription peut alors avoir lieu (Figure B-7).

L'induction est effectuée sur une culture bactérienne en milieu LB-Amp *via* l'ajout d'IPTG (0,5 mM). Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation et lavées dans du Knapp. L'étude de l'activité de dégradation est effectuée dans un milieu MSA (30 mg L<sup>-1</sup>).

Un test de dégradation a été effectué par un suivi HPLC sur les protéines intracellulaires.

Ces travaux ont été réalisés par Sajid Noor et Colin Scott (CSIRO-Canberra- Australie).

## 11.2 Construction des vecteurs de surexpression

Les gènes *atzA* clonés ont été réamplifiés par PCR en utilisant la polymérase Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Finland) et les amorces *EatzA-F* et *EatzAR* selon le protocole du fabricant. Ces amorces ont été dessinées de façon à introduire des sites de restriction *NdeI* et *BamHI* respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'amplicon. De plus, les morceaux manquants de ces mêmes extrémités ont pu être réinsérés grâce à ces amorces (basés sur la séquence de *Pseudomonas* sp. ADP (De Souza *et al.*, 1996). Les amplicons ont été excisés du pGEM-T Easy et modifiés en utilisant *NdeI* et *BamHI* ainsi que la phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIP) (New England BioLabs, USA), suivant le protocole du fabricant. Les fragments ainsi digérés ont été reliés dans un vecteur d'expression préalablement ouvert pCS150 muni

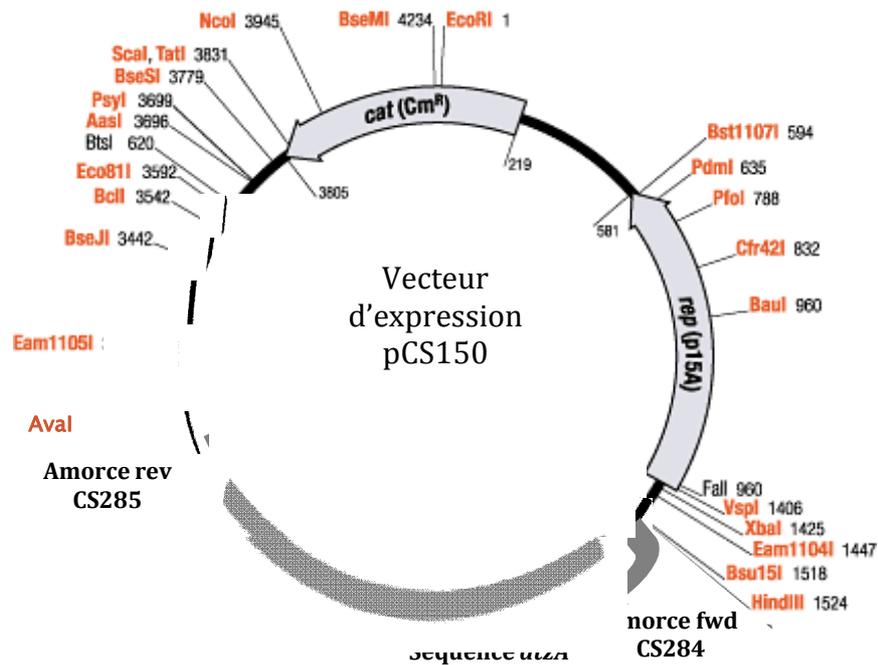


Figure B-8 : schéma du vecteur d'expression pCS150. Ce vecteur synthétique porte la séquence du gène *atzA* (inséré entre *AvaI* et *Hind III*) ainsi que le réplicon *rep* responsable de la réplication du plasmide et le gène *cat* qui code pour une chloramphénicol acétyl transférase, lui conférant la résistance au chloramphénicol (d'après Scott et al., 2009).

d'un tag-histidine (Scott *et al.*, 2009) (Figure B-8), grâce à une ADN ligase T4 (New England BioLabs, USA). Les bactéries compétentes *E. coli* JM109 (Promega, USA) ont été utilisées pour la transformation avec la réaction de ligation. La vérification a été effectuée par une digestion *NdeI* et *BamHI* ainsi que par séquençage utilisant les amorces spécifique pCS150F et pCS150R (Micromon DNA Sequencing Facility ; Monash University, Melbourne, Australia).

### 11.3 Mutagenèse dirigée

Afin d'appréhender les effets de différences ponctuelles entre la séquence en acides aminés des souches natives et les autres souches porteuses du gène *atzA*, des réactions de mutagenèse dirigée ont été effectuées. Ainsi, des mutations ponctuelles ont été introduites volontairement dans le gène *atzA* de *Pseudomonas* sp. ADP puis les gènes ainsi obtenus ont également été introduits dans les vecteur pCS150.

Cette mutagenèse dirigée a été effectuée en superposant deux amplicons obtenus par PCR, chacun contenant une mutation unique introduite dans l'amorce et complémentaire de la mutation de l'amorce de l'autre amplicon. La totalité du gène a ensuite été reconstitué à partir des zones chevauchantes en utilisant l'ADN polymérase Finnzymes's Phusion high-fidelity selon le protocole suggéré par le fabricant. L'efficacité du clonage de ces fragments a été vérifiée par une digestion *NdeI* et *BamHI* ainsi que par séquençage de la zone encadrée par les amorces pCS150F et pCS150R.

### 11.4 Purification protéique

Les différentes protéines AtzA munies d'un tag hexa-histidine ont été exprimées à partir du vecteur pCS150 en faisant croître la cellule hôte (*E. coli* JM109) dans du milieu LB supplémenté de 34  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de chloramphénicol à 28°C (agité à 200 rpm) pendant 48h.

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5300 rpm pendant 15 min (Avanti J-E centrifuge, Beckman Coulter, USA).

Puis le culot cellulaire a été re-suspendu dans un tampon sodium-phosphate (pH 7,0) et lysé en utilisant un réactif d'extraction (BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Merck, Germany)) selon les instructions du fabricant. Les protéines ont enfin été purifiées sur une colonne d'affinité en résine (TALON  $\text{Co}^{2+}$ ) (Clontech, USA) selon le protocole en vigueur. La pureté protéique a été vérifiée par SDS-PAGE dans un gel pré-coulé NuPAGE Novex 10% (w/v) bis-tris (Invitrogen, USA) et coloré au bleu de Coomassie brillant (Sigma-Aldrich, USA). La concentration protéique a enfin été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm dans un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, USA) en appliquant un



coefficient d'extinction molaire de  $53,860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Ce dernier ayant été préalablement calculé en comparant la séquence d'AtzA dans le serveur Expasy tool server, <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> (Gasteiger *et al.*, 2005).

## 12. Analyse bioinformatique

Les analyses de séquences et des profils nucléiques et protéiques ont été réalisées en utilisant les logiciels SeqMan (DNASTar), ClustalW/X et BlastX/P. La présence de séquences d'insertions a été recherchée grâce à ISFinder

- SeqMan (Swindell and Plasterer, 1997) : logiciel permet l'analyse d'alignement de séquences d'ADN
- ClustalW/X (Thompson *et al.*, 1994) : ce logiciel d'analyse *et* alignement d'acides nucléiques et de protéines
- BlastX/P (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)(Altschul *et al.*, 1990): logiciel de comparaison de séquences à une base de données
- ISFinder (Siguiet *et al.*, 2006b) : logiciel de recherche d'IS par homologie de séquence.

## 13. Modélisation et analyse statistique

### 13.1 Modélisation de la croissance

Les courbes de croissance microbienne obtenues ont été modélisées selon le modèle de Gompertz (1825) modifié (Zwietering *et al.*, 1990) en utilisant le logiciel SigmaPlot® 6.10. L'équation décrit le postulat suivant lequel « la croissance bactérienne est sigmoïdale » selon la formule :  $Y = A \cdot \exp\{-\exp[1 + \mu m \cdot \exp(1) \cdot (\lambda - t) / A]\}$  où Y correspond à la  $DO_{600nm}$ (UA); le temps (t) ;  $\mu m$  la vitesse maximale de croissance ( $h^{-1}$ ) ; A la  $DO_{600nm}$  maximale obtenue (UA) et  $\lambda$  le temps de latence (h). Les paramètres obtenus ont été validés par un test de Student ( $p < 0,05$  ;  $n = 3$ ).

### 13.2 Modélisation de la minéralisation

Le même modèle a été utilisé pour la minéralisation de l'atrazine.

Dans ce cas : Y correspond au pourcentage d'atrazine minéralisée (%); t au temps (h) ;  $\mu m$  la vitesse maximale de minéralisation ( $h^{-1}$ ) ; A au pourcentage d'atrazine minéralisée (%) et  $\lambda$  au temps de latence (h). Les paramètres obtenus ont été validés par un test de Student ( $p < 0,05$  ;  $n = 3$ ).



### 13.3 Analyses statistiques

Pour comparer différentes modalités entre elles, les données ont été soumises à une analyse de variances (ANOVA) suivie d'un test de Fisher *a posteriori* ( $p < 0,05$ ) à l'aide du logiciel Statview 5.0 (SAS Institute, Inc). Selon les expériences, le nombre de répétitions variait de 3 à 5.



# **RESULTATS**



**AXE 1**



## RESULTATS

### **AXE 1 : DIVERSITE GENETIQUE DU GENE ATZA AU SEIN DE POPULATIONS MICROBIENNES DEGRADANT L'ATRAZINE : impact sur l'activité catalytique des chlorohydrolases et conséquence sur l'évolution des populations dégradant l'atrazine.**

#### **Préambule**

J'ai réalisé ce travail en étroite collaboration avec Sajid Noor, étudiant en thèse de doctorat sous la direction du Dr Colin Scott (CSIRO, Canberra, Australie). L'analyse des séquences nucléiques *atzA* amplifiées de différentes souches microbiennes a été réalisée dans le laboratoire de Microbiologie des Sols et de l'Environnement. Le travail consistant à (i) caractériser les activités enzymatiques AtzA des différentes souches ainsi que celles de mutants obtenus par mutagenèse dirigée et à (ii) modéliser la structure tri-dimensionnelle des enzymes AtzA a été réalisé par Sajid Noor dans le laboratoire des sciences de l'écosystème (CSIRO, Canberra, Australie) sous la direction du Dr Colin Scott. Les résultats de cette étude sont présentés ci-après. Ils feront l'objet d'une publication scientifique qui sera soumise d'ici la fin de l'année 2011.

#### **Objectifs**

Ce travail a consisté à évaluer la diversité des séquences nucléotidiques du gène *atzA* hébergé par différentes souches microbiennes isolées de sols espacés et capables de dégrader l'atrazine. L'objectif recherché était d'évaluer le niveau de conservation de ce gène au sein de souches microbiennes d'origines géographiques différentes afin d'apporter des éléments de discussion au débat actuel sur l'évolution de ce gène nouvellement recruté. L'hypothèse que nous avons formulée était que si du polymorphisme était observé au sein de la séquence du gène *atzA*, alors la fixation de la mutation au sein du génome de la souche avait dû être possible en raison du gain de fitness qu'il représentait. Afin de vérifier cette hypothèse, les séquences en amino-acides déduites des séquences nucléiques ont été étudiées en détails. L'alignement multiple de ces séquences a permis de mettre en évidence l'existence de quelques mutations non silencieuses. Afin d'estimer leur impact sur la structure et l'activité de l'enzyme AtzA, la structure tridimensionnelle des différentes enzymes a été modélisée et l'activité des enzymes mesurée. Par ailleurs, nous avons tenté de déterminer l'importance de chaque amino-acide muté dans le fonctionnement d'AtzA par une approche de mutagenèse dirigée. L'ensemble de ces résultats est présenté ci-après.



## 1. Abstract

The AtzA<sub>WT</sub> atrazine dechlorinase enzyme was originally isolated from a bacterium found in atrazine contaminated agricultural soil in the 1990s. It only differs by eight amino acid substitutions from a melamine deaminase isolated from another bacterium found in soil contaminated with industrial effluent. This study finds that AtzA has continued to evolve in a bacterial isolate obtained from agricultural soil, with three further functionally important amino acid changes, but no synonymous substitutions, accumulating. The evolved variant has higher specificity for simazine and greater affinity for a metal ion required for activity. Two of the three amino acid differences contribute to these differences. Intriguingly the third is the same as one of the nine distinguishing the melamine deaminase from AtzA<sub>WT</sub>. Notably also, ongoing maintenance of the original AtzA<sub>WT</sub> - containing isolate in laboratory culture for 12 years in a medium containing high concentrations of atrazine has led to the fixation of another amino acid substitution which substantially reduces both activity for *s*-triazines and thermostability. It is suspected that the high concentrations of atrazine in the medium have relaxed the selection for a highly efficient atrazine dechlorinase activity, but that there is some, as yet unknown, counter selection for the activity of this enzyme.

## 2. Introduction

The genetic and biochemical systems that have appeared in various bacteria over the last seventy years to enable them to degrade synthetic pesticides represent ideal model systems for studying the molecular mechanisms underlying the evolution of new biochemical functions (Copley, 2009; Lawrence, 2009; Russell *et al.*, 2011). Several gene/enzyme systems encoding such functions have now been identified and shown to be widespread both geographically and phylogenetically; some of the best characterised examples include the OPH/OpdA enzymes for degrading organophosphate insecticides (Horne *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009) and the AtzA atrazine chlorohydrolase enzyme for degrading triazine herbicides (De Souza *et al.*, 1996; Wackett *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2009). Much of the focus to date has been on the origins of these novel activities, the general finding being that they have diverged substantially and presumptively very rapidly from their putative ancestral families. Equally interesting but much less studied however the issue of their ongoing evolution is once some form of the new function has been acquired.



AtzA and the *s*-triazine herbicides are a very promising model for investigating such issues. *s*-triazines such as atrazine and simazine represent a new class of chemistry for the biosphere and have a range of acute and chronic toxicities to various biota at very low doses (Sathiakumar and Delzell, 1997; Hayes *et al.*, 2002; Huff and Sass, 2007; Jowa and Howd, 2011). Conversely, however, they are a rich source of nitrogen for microorganisms able to degrade them (Crawford *et al.*, 1998; Bichat *et al.*, 1999). They have been widely used as herbicides in agriculture around the world for several decades, albeit concerns about chronic human and animal health problems have seen them deregistered in several western countries in the last decade (Perry *et al.*, 2004; Ackerman, 2007). Despite their declining use, problems with residues in ground water and adjacent soils persist because the compounds are relatively stable and, as a consequence of their relatively high aqueous solubility, are mobile in soil acting as a recharge zone of aquifers (Belluck *et al.*, 1991; Gavrilescu, 2005; van der Meer, 2006).

The *atzA* gene was first isolated from a pseudomonad derived from contaminated soils in Madison (Minnesota, USA) in 1996 (Mandelbaum *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1996) and identical sequences were described soon after from various bacteria from diverse locations (Struthers *et al.*, 1998b; Topp *et al.*, 2000a; Rousseaux *et al.*, 2002; Devers *et al.*, 2004). The AtzA enzyme has since been heterologously expressed and characterised biochemically (De Souza *et al.*, 1996; Raillard *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2009) It is a *ca.* 52 kDa homotetrameric protein from the amidohydrolase family with quite good kinetics for atrazine dechlorination ( $k_{\text{cat}}/K_M$  value of  $1.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ), albeit relatively poor affinity ( $K_M > 159 \mu\text{M}$ ) for the substrate. Unusually, another gene closely related to *atzA* has also been recovered from bacteria in contaminated effluent and the enzyme which it encodes has negligible activity for atrazine but good activity ( $k_{\text{cat}}/K_M$  value of  $1.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) as a deaminase for another xenobiotic, melamine (Eaton and Karns, 1991a; Seffernick and Wackett, 2001; Scott *et al.*, 2009). This gene, *triA*, differs at nine non-synonymous sites but no silent sites from *atzA*, suggesting that the two sequences represent lineages that have recently diverged from one another under the selection pressure exerted by the abundance of the two xenobiotics. Biochemical analyses of synthetic intermediate forms indicate that several of the amino acid differences contribute to the qualitative difference in function (Raillard *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2009). Thus the AtzA/TriA clade is proving a versatile template for the evolution of new biochemical functions.

This chapter presents a biochemical and molecular characterisation of two recently isolated AtzA variants, one obtained from agricultural soil that had been recurrently exposed to *s*-triazine

**Tab. C-I : PCR primers used for amplifying 16S rRNA and *atzA* sequences and to construct *atzA* variants. All primers were synthesized by GeneWorks (Hindmarsh, Australia).**

Primer name	Sequence (5' → 3')	Description
27f 1492r	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGHTACCTTGTTACGACTT	Used to amplify the 16S rRNA sequences.
Forward Reverse	GGATCAGTACCGCAGAGTCC CTGGGTTAGCCACCATGTTC	Used to locate the <i>atzA</i> genes in the genome of <i>Chelatobacter heintzii</i> and <i>Pseudomonas</i> sp. strains.
<i>EatzA</i> -F <i>EatzA</i> -R	AACCAAACCACATATGCAAACGCTCAGCATCCAGCACGG- TACCCTCGTCACGATGGATCAGTACCGCAGAG TGTATTATTGGATCCTAGAGGCTGCGCCAAGCTGGGTTA- GCCACCATGTTCCGCCGC	Introduced <i>Nde</i> I and <i>Bam</i> HI restriction sites at 5' and 3' ends of the amplicons respectively for cloning purposes and to complete the 5' and 3' ends of the <i>atzA</i> genes with respect to <i>atzA</i> <sub>WT</sub> .
<i>natzA</i> -F <i>natzA</i> -R	AGAAGAACATATGCAAACCTGTCCATCCAGCACGGGACT TGTTGGTTGGATCCTTAGAGGCTGCGCCAAGC	Used during cloning experiments.
<i>EatzA</i> -92F <i>EatzA</i> -92R	TGGCTGTTCAACGTTTTGTACCCGGGACA TGTCCCGGTACAAAACGTTGAACAGCCA	Introduced single mutation for V92L in <i>atzA</i> <sub>WT</sub> .
<i>EatzA</i> -170F <i>EatzA</i> -170R	GGGTATGTGGACACCTTGAAGGCTCGCTC GAGCGAGCCTTCAAGGTGTCCACATACCC	Introduced single mutation for A170T in <i>atzA</i> <sub>WT</sub> .
<i>EatzA</i> -296F <i>EatzA</i> -296R	CGCCACAATGTGAAGGTCACGTCGAGGTTGTG CACAACCTGCGACGTGACCTTACATTGTGGCG	Introduced single mutation for A296T in <i>atzA</i> <sub>WT</sub> .
pCS150-F pCS150-R	GACGTGCGGGATGACCACCCAGTTGCGGTGC GAGATTACGCGCAGACCAAACGATCTCAAGAAGATCATC	Vector pCS150 specific primers, used to sequence the <i>atzA</i> clones.

herbicides and another from the original atrazine-degrading bacterium which has been maintained in the laboratory with selection for atrazine catabolism for the last ~ 12 years.

### 3. Experimental

The work described in sections 4.2.1 and 4.2.2 below was conducted at INRA, France, by Frederique Changey and Dr. Fabrice Martin-Laurent. The remainder of the work was carried out by Sajid Noor.

#### 3.1 Strains

Atrazine-mineralizing bacterium was isolated from agricultural soil in France in 2000. This soil cropped with corn as a monoculture had been recurrently exposed to *s*-triazine herbicides for many years up until 2003, when their use was banned in Europe (Perry *et al.*, 2004; Ackerman, 2007). The bacterium was isolated by enrichment culture as described by Rousseaux *et al.* 2001. The original *Pseudomonas* sp. strain ADP obtained from the laboratory of Ed Topp (AgriFood Canada, Canada) from which *atzA* was isolated was maintained in MSA media for ~ 12 years, generating *Pseudomonas* sp. strain ADP isolate mse.

The atrazine degrading strains were maintained in the laboratory by sub-culturing in either liquid media incubated for week at 28°C with shaking at 150 rpm on mineral salt medium supplemented with 30 mg. L<sup>-1</sup> atrazine or on a solid mineral salt medium supplemented with 1.5% (w/v) agar and 500 mg.L<sup>-1</sup> atrazine. Atrazine was provided as technical grade material (99% purity) obtained from Ciba Geigy, and was the sole source of nitrogen (Devers *et al.*, 2008). Genomic DNA was extracted from a 75 mL suspension of the newly isolated atrazine degrading strain above using the QIAGEN Blood and Cell culture DNA Midi Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, France). DNA was quantified at 260 nm and diluted to 10 ng.µl<sup>-1</sup> and 16S rRNA sequences were amplified from it using the primers 27f and 1492r (Tab. C-I) (Gurtler and Stanisich, 1996). Partial 16S rRNA sequences were amplified by PCR in a 50 µL volume reaction containing 1 µM of the primers, 200 µM of each dNTP (Promega, USA), 2.5 U of GoTaq DNA polymerase (Promega, USA) and 25 ng of DNA. The PCR was carried out in a PTC-200 gradient cycler (MJ Research) under the following conditions : 5 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C, plus an additional 15-min cycle at 72°C. The size of the 16S rRNA amplicon was checked by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel and the amplicon was then purified from the gel using the QIAEX II Gel Extraction Kit following the protocol recommended by Qiagen (Germany). The purified 16S rRNA amplicon was then quantified by spectrophotometry and cloned in the pGemT Easy vector (Promega, USA).



Recombinant clones, white in colour, were then screened by PCR using SP6 and T7 primers. Clones having inserts of the expected size were then fully sequenced on both DNA strands by Beckman Coulter Genomics (Grenoble, France). The sequence was then compared to known sequences found in the GenBank database using Blast.

### 3.2 *atzA* sequences

A large portion of the *atzA* gene (1367 nt) ( $\approx 96\%$  of the coding sequence, excluding 40 nt at the 5' end and 17 nt at the 3' end) was amplified from the new atrazine degrading strain and the mse isolate by PCR using : 1  $\mu\text{M}$  each of the Forward and Reverse primers (Tab. C-I), 25 ng of DNA template, 0.2 mM of dNTPs and 1.25U of Taq DNA polymerase (Q-biogene, France) in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . PCR was carried out using a PTC 200 gradient cyler (MJ Research, Waltham, MA) as follow : 5 min at 95°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 2 min at 72°C, plus an additional 10-min cycle at 72°C. The PCR products were then separated by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and photographed with a CCD camera. The amplicons were extracted and purified using the QiaEx Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, France). Purified *atzA* amplicons were then cloned in pGem-T Easy vector according to the manufacturer's instruction (PROMEGA, France). Sequencing of each amplicon was performed by Beckman Genomics (Grenoble, France) using SP6 and T7 universal primers.

### 3.3 Bacterial culture

*Escherichia coli* JM109 (Promega, USA) was used as a cloning strain for the transformation of expression vectors. The bacterium was routinely grown at 28°C in Lennox broth (LB) (Lennox, 1955) or at 37°C on 1.5% (w/v) LB agar (LBA) containing appropriate antibiotics. LB, LBA and chloramphenicol stocks were prepared as described in Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.4 Construction of expression vectors

The cloned *atzA* genes were amplified by PCR using Phusion high-fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Finland) and the primers *EatzA-F* and *EatzAR* (Tab. C-I) according to the manufacturer's protocol. The primers were designed to introduce *NdeI* and *BamHI* restriction sites at the 5' and 3' ends of the amplicons respectively for cloning purposes and to complete the 5' and 3' ends of the genes. The 5' (40 nts) and 3' (17 nts) extensions were based on the sequence of the *atzA* gene from *Pseudomonas* sp. strain ADP (De Souza *et al.*, 1996). Amplicons from the pGEM-T Easy clones were excised and modified using *NdeI*, *BamHI* and calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) (New England BioLabs, USA), respectively, following the manufacturer's protocols. The digested amplicons were ligated with similarly digested expression vector pCS150



(Scott *et al.*, 2009) using T4 DNA ligase (New England BioLabs, USA). *E. coli* JM109 competent cells (Promega, USA) were utilised for transformation of ligation reactions. All the constructs were checked by digestion with *NdeI* and *BamHI* and DNA sequencing using vector specific primers pCS150F and pCS150R at Micromon DNA Sequencing Facility (Monash University, Melbourne, Australia).

### 3.5 Site-directed mutagenesis

To investigate the effects of individual amino acid differences between the two newly isolated genes and the original *atzA* (ie that found in the original *Pseudomonas* sp. strain ADP, hereafter referred to as *atzA<sub>WT</sub>*), site-directed mutagenesis was performed to introduce those mutations into *atzA<sub>WT</sub>*, followed by cloning into the pCS150 vector. Site-directed mutagenesis was achieved by generating two overlapping amplicons from a parent gene by PCR, each containing single nucleotide mutations (introduced in the primers) that exactly complemented the mutations made in the other amplicon. The full length gene was then reconstituted from the overlapping amplicons by PCR using Finnzymes's Phusion high-fidelity DNA polymerase according to its protocol. The PCR primers used in these cloning procedures are noted in Tab.C-I. Successful cloning of the mutant genes was confirmed by digestion with *NdeI* and *BamHI* and DNA sequencing as above, using the vector-specific primers pCS150F and pCS150R (Tab.C-I).

### 3.6 Protein purification

Hexa-histidine tagged AtzA variants were expressed from pCS150 by growing the host (*E. coli* JM109) in LB medium supplemented with 34  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  chloramphenicol at 28°C (shaken at 200 rpm) for 48 hours. The cells were harvested by centrifugation at 5300 rpm for 15 minutes in an Avanti J-E centrifuge (Beckman Coulter, USA). The cell pellets were resuspended in sodium phosphate buffer (pH 7.0) and the cells lysed using BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Merck, Germany) according to the manufacturer's protocol. The proteins were purified by TALON Co<sup>2+</sup> metal affinity resins (Clontech, USA) following the manufacturer's instructions. Protein purity was monitored by SDS-PAGE using NuPAGE Novex 10% (w/v) bis-Tris precast gels (Invitrogen, USA) and staining the gels with Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, USA). Protein concentrations were estimated by measuring absorbance at 280 nm using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Products, USA) assuming a molar extinction coefficient of 53,860  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . The latter was calculated at ProtParam by pasting the AtzA amino acid sequence into the ExPasy tool server, <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> (Gasteiger *et al.*, 2005).

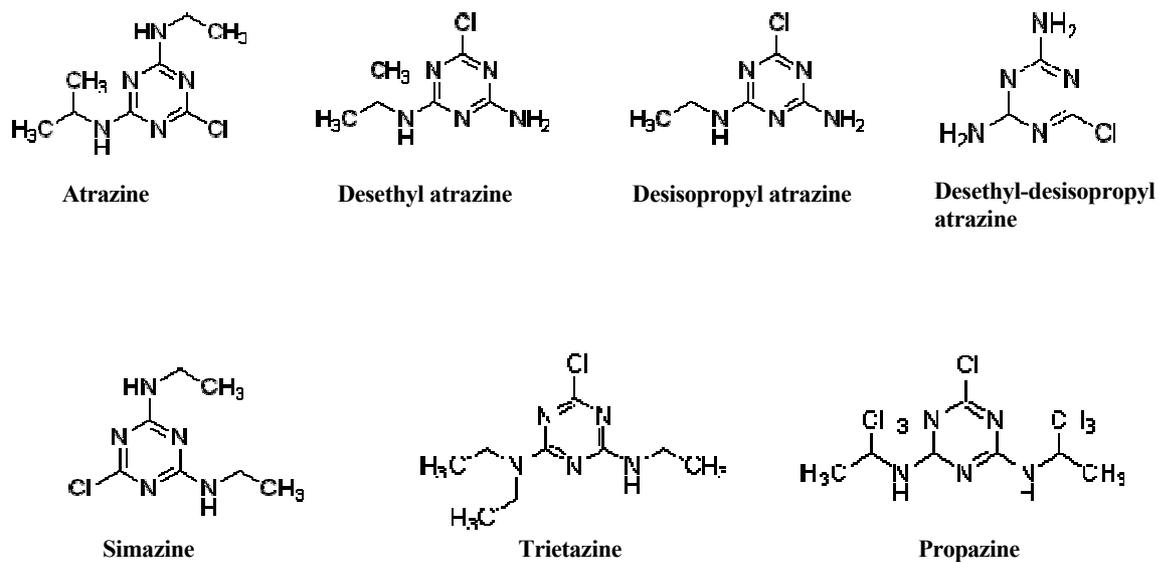


Figure C-1: substrates used in the enzyme assays described in the text.

### 3.7 Enzyme assays

The purified enzymes were tested for their activities against seven *s*-triazines, including atrazine and three other herbicides plus three atrazine metabolites commonly reported in contaminated soils (Fig. C-I). These were all analytical grade reagents from Sigma-Aldrich (USA). Substrate hydrolysis was assayed spectrophotometrically using a SpectraMAX 190 spectrophotometer (Molecular Devices, USA) at 265 nm in 25 mM 3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) buffer (pH 6.9) with 100 nM enzyme and substrate concentrations in the range of 5  $\mu$ M – 150  $\mu$ M at 25°C as previously described (Mulbry, 1994). The water solubility of atrazine and the other substrates does not exceed  $\approx$  150  $\mu$ M at 22°C, which is lower than the estimated  $K_M$  of AtzA for *s*-triazine substrates (De Souza *et al.*, 1996; Seffernick *et al.*, 2002), making direct measurement of  $k_{cat}$  and  $K_M$  impossible. Therefore, the second order rate constant ( $k_{cat}/K_M$ ) was calculated for The water solubility of atrazine and the other substrates does not exceed  $\approx$  150  $\mu$ M at 22°C, which is lower than the estimated  $K_M$  of AtzA for *s*-triazine substrates (De Souza *et al.*, 1996; Seffernick *et al.*, 2002), making direct measurement of  $k_{cat}$  and  $K_M$  impossible. Therefore, the second order rate constant ( $k_{cat}/K_M$ ) was calculated for each enzyme under the assumption that when the substrate concentration  $[S]$  is much less than  $K_M$ , the reaction rate,  $V$ , can be estimated using equation 4-1.

$$V = [E][S] \frac{k_{cat}}{K_M} \quad \text{Eq. 4-1}$$

### 3.8 Estimation of the affinity of $Fe^{2+}$ binding

Purified AtzA variants were dialyzed twice against 10 mM 1,10-phenanthroline (Sigma-Aldrich, USA) to remove bound metal and the 1,10-phenanthroline was then removed by dialysis against sodium phosphate buffer (pH 7.0). The apo-enzymes were then incubated at 25°C for 90 minutes with different concentrations of  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  in the range of 0 – 200  $\mu$ M and tested for activity against 100  $\mu$ M simazine as described above. The dissociation constant ( $K_d$ ) were calculated in GraphPad Prism software (GraphPad software Inc., USA) using the activities at each  $Fe^{2+}$  concentration as an indirect measure of the proportion of  $Fe^{2+}$  occupied enzyme. The binding constant  $K_d$  was determined by fitting the data to the corresponding binding equation (Eq. 4-2) for each enzyme.

$$V_o = \frac{(V_{max} \times [Fe^{2+}])}{(K_d + [Fe^{2+}])} \quad \text{Eq. 4-2}$$

where the  $V_o$  and  $[Fe^{2+}]$  are initial velocity and metal ion concentration, respectively;  $V_{max}$  is the maximum velocity; and  $K_d$  is the dissociation constant.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
atzAWT  atgcaaacgctcagcatccagcacggtaccctcgtcacgatggatcagtaaccgagagtccttggggaatagctgggttcacgtgcaggatggacggatcg
atzACh  ~~~~~
atzAPs  ~~~~~

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
atzAWT  tcgcgctcggagtgcaacgagcgagtcggtgcctcgcgagcgagtcgggtgatcgatgcaacgcgcaagtcggtttaccggtttcaatgcccacac
atzACh  .....
atzAPs  .....

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
atzAWT  ccatgtgaaccagatcctcctgcgaggggcccctgcacggcgctcaattctatgactggctgtcaacgttggatccgggacaaaaggcgatgaga
atzACh  .....
atzAPs  .....

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
atzAWT  ccggaggagctagcgggtggcgggtgaggtgtattgtgcggaagctgtgcgagcgaggttacgacgatcaacgaaaacgcgattcggccatctaccag
atzACh  .....
atzAPs  .....

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
atzAWT  gcaacatcgaggccgagatggcgggtctatgggtgagtggtgtgagggctcgtctacgcccgatgttctttgatcggatggacggggcgattcaagggtta
atzACh  .....
atzAPs  .....

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
atzAWT  tgtggacgcttgaaggctcgtctccccaaagtcgaactgtgctcgatcattggaggaaacggctgtggcacaagatcggatcacagccctgtcagatcag
atzACh  .....
atzAPs  .....

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
atzAWT  tatcattggacggcaggaggtcgatatacagtttggccgctcctgccactaccacggcggtgacagttgaaggaatggatgggcacaagccttcgccc
atzACh  .....
atzAPs  .....

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
atzAWT  gtgatcgggagcgttaattgtggacgcttcacatggcggagagcgatcattgatgagcggattcatgggatgagtcocgocgagttacatggaggtttacggact
atzACh  .....
atzAPs  .....

```

Figure C-2: alignment of the nucleotide sequences of atzAWT, atzACh and atzAPs. Only differences from atzAWT are shown in the other two sequences, with identical nucleotides shown as dots. ~ shows non-aligned nucleotides where the amplicons from the other two genes did not cover the entire atzA gene.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
AtzAWT  MQTLSIQHGTLVMDQYRRVLGDSWVHVQDGRIVALGVHAESVPPPADRVIDARGKVVLPGFINAHTHVNQILLRGGPSHGRQFYDWLFNVVYPGQKAMR
AtzACh  ~~~~~
AtzAPs  ~~~~~

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
AtzAWT  PEDVAVRVLRYCAEAVRSGITINENADSAIYPGNIEAAMAVYGEVGRVRYARMFFDRMDGRIQGYVDALKARSPQVELCSIMEETAVALKDRITALSDQ
AtzACh  .....
AtzAPs  .....

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
AtzAWT  YHGTAGGRISVWPAPATTTAVTVEGMRWAQAFARDRAVMWTLHMAESDHERIHGMSPAEYMECYLLDERLQVAHCVYFDRKDVRLLRHNVKVASQVV
AtzACh  .....
AtzAPs  .....

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AtzAWT  SNAYLGSVAVPPEMVERGMAVGI GTDNGNSNDSVNMI GDMKFAHIHRAVHRDADVLTPEKILEMATIDGARSLGMDHEIGSIETGKRADLILLDLRHP
AtzACh  .....
AtzAPs  .....

      410     420     430     440     450     460     470
AtzAWT  QTPPHHLAATIVFQAYGNEVDTVLIDGNVVMENRRLSFLPPERELAFLEEAQSRATAILQRANMVANPAWRSL*
AtzACh  .....
AtzAPs  .....

```

Figure C-3: alignment of the inferred protein sequences for AtzAWT, AtzACh and AtzAPs. Differences, similarities and non-aligned regions are shown as per the format in Fig. C-2

### 3.9 Estimation of thermal stability

The apparent melting temperatures of the purified enzymes were determined by incubating each enzyme at temperatures ranging from 30°C - 70°C for 10 minutes prior to spectrophotometric enzyme assay with simazine as described above. Apparent melting temperatures ( $T_m^{app}$ ) were then determined by fitting the data for each enzyme to the corresponding binding equation (Eq. 4-3), using GraphPad Prism software (Graphpad software Inc.).

$$V = 1 + 10^{(\log T_m^{app} - T)} \quad \text{Eq. 4-3}$$

where the V and T are initial velocity ( $\mu\text{mol}/\text{sec}$ ) and temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) respectively, and  $T_m^{app}$  is the temperature at which the enzyme has 50% of its maximal activity.

## 4. Results

### 4.1 Characterisation of the atrazine-degrading isolates

16S rDNA analysis showed 99% identity between the newly derived atrazine degrading strain and as *Chelatobacter heintzii* strain DSM6450T (GenBank accession number AJ011762) as previously reported by Rousseaux *et al.* 2001 and it is therefore named *Chelatobacter heintzii* strain ATZ. This strain shows an atrazine-degrading potential made of the *atzABC*, *trzD* genes. The *atzA* gene is borne on a plasmid of 77 kb and the *atzBC*, *trzD* are borne on a large plasmid of 199 kb (Devers *et al.* 2008). As result of almost 12 years of maintenance of the *Pseudomonas* sp. ADP isolate (Mandelbaum *et al.*, 1995) on MSA medium, a new *Pseudomonas* sp. ADP strain named mse evolved. The atrazine-degrading genetic potential of the strain *Pseudomonas* sp. ADP strain mse is made of the *atzABCDEF* genes is borne on the pADP1 plasmid of 111 kb. Interestingly, these two strains showing different genetic background as well as different atrazine-degrading genetic potential are able to mineralize atrazine within few hours (DT50 of approximately 15 hours in liquid MSA medium). On rich medium, they showed similar growth kinetic characteristics ( $V_{max}$  0.12 AU.h<sup>-1</sup>). Sequencing of near full length *atzA* amplicons (1,367 nt) from these strains showed them to be > 99% identical to the *atzA<sub>WT</sub>* originally isolated from *Pseudomonas* sp. strain ADP by de Souza *et al.* (De Souza *et al.*, 1996). The *Chelatobacter* genes contained two ubiquitous mutations (G274T, G508A, generating V92L and A170T substitutions) and one common, but not invariant, mutation (G886A conferring an A296T amino acid replacement) compared with *atzA<sub>WT</sub>*. Genes containing all three of the common mutations were termed *atzA<sub>Cl</sub>*. The *atzA<sub>P</sub>* gene differed at just one nucleotide position from *atzA<sub>WT</sub>* (A463G; Fig. C-2), but again this was a non-synonymous substitution (generating the M155V change; Fig.C-3).

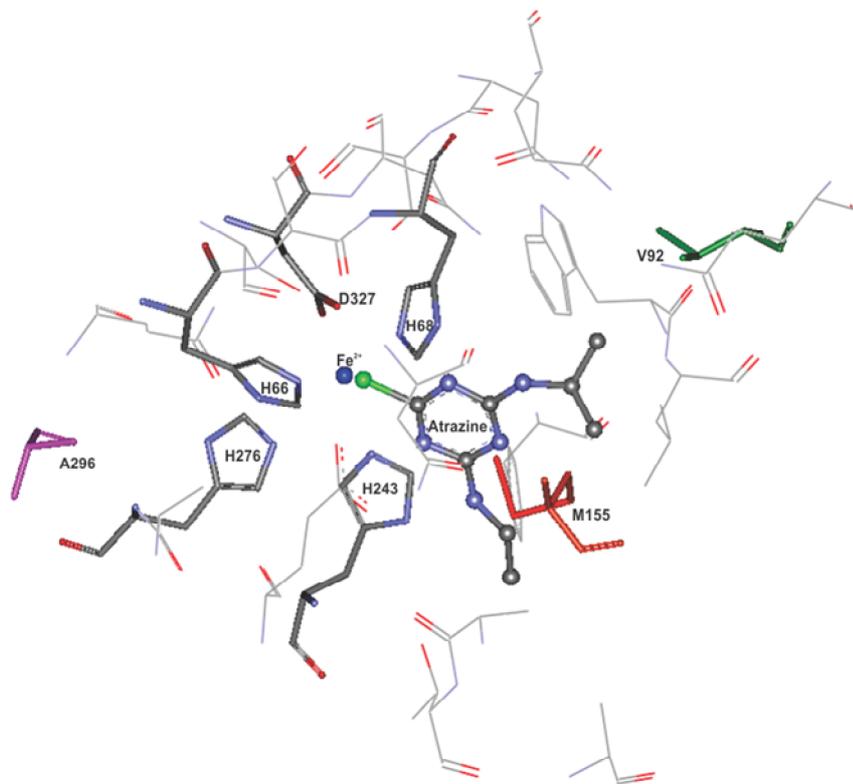


Figure C-4: active site amino acid residues in the AtzA homology model with bound atrazine and  $\text{Fe}^{2+}$  (Scott *et al.*, 2009a). Three of the amino acid substitutions are shown; V92L (green), A296T (purple) and M155V (red) (A170T could not be plotted in the model reliably – see text). The four histidines (66, 68, 243 and 276) and the aspartic acid (D327) that are  $\text{Fe}^{2+}$  ligands are shown as grey sticks and atrazine is shown in ball and stick form. Other residues within the active site are shown as grey lines. This image was created using Discovery Studio Visualizer 2.5, (Accelrys, USA).

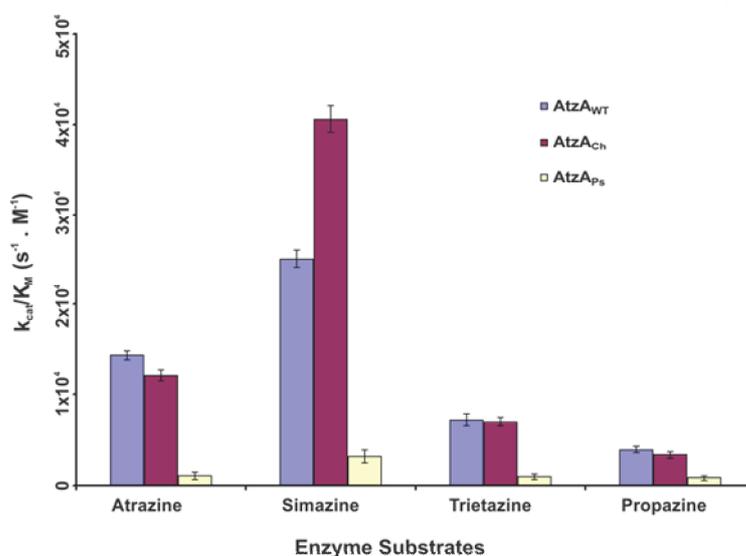


Figure C-5 : the specificity (kcat/KM) of AtzAWT, AtzACh and AtzAPs against atrazine, simazine, trietazine and propazine. The error bars show standard errors calculated from triplicates value.

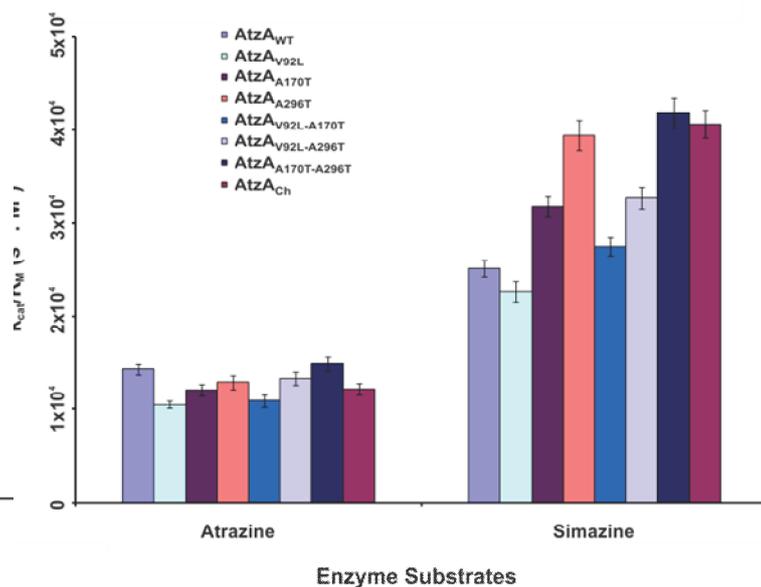


Figure C-6: specificity (kcat/KM) of AtzAWT, AtzACh, and mutant ATzAWT enzymes against atrazine and simazine. The error bars show standard errors calculated from triplicates value.

## 4.2 Location of the naturally occurring substitutions in AtzA

A homology model of the AtzA<sub>WT</sub> enzyme was produced previously and used successfully to redesign the active site of the enzyme to reduce its  $K_M$  for atrazine (Scott *et al.*, 2009). Here we have used the same homology model to map the locations of the amino acid differences among the three AtzA sequences (Fig. C-4). Only three of the four substitutions (V92L M155V and A296T) could be accurately located using the homology model, the fourth (A170T) lying in a region of primary structure that could not be accurately mapped to the template used in the model (a protein of unknown function from *Thermotoga maritima*, PD : 1J6P). The M155V substitution in AtzA<sub>Ps</sub> was located in a side chain-binding pocket within the active site cavity. The V92L substitution in AtzA<sub>Ch</sub> was located within 5Å of the bound atrazine. The A296T substitution in AtzA<sub>Ch</sub> was located in the second shell, potentially making contact with the metal-binding histidine residues (H66, H68, H243 and H276).

## 4.3 Kinetic properties of the naturally occurring AtzA variants

Kinetic analysis showed that the purified AtzA<sub>WT</sub>, AtzA<sub>Ps</sub> and AtzA<sub>Ch</sub> enzymes were all active against the chloro-*s*-triazines atrazine, simazine, propazine and trietazine but not against the common environmental atrazine metabolites desethyl atrazine, desisopropyl atrazine or desethyl-desisopropyl atrazine (Winkelmann and Klaine, 1991) (Fig. C-5). The specificity of the enzymes towards atrazine as measured by estimates of  $k_{cat}/K_M$  varied from  $1.1 \times 10^3$  (s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>) for AtzA<sub>Ps</sub> to  $1.5 \times 10^4$  (s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>) for AtzA<sub>WT</sub>, with the value for AtzA<sub>Ch</sub> only slightly lower than that for AtzA<sub>WT</sub>. All three enzymes, but particularly AtzA<sub>Ch</sub>, displayed greatest activity for simazine and all three also showed much lower activity with trietazine and propazine than with the other substrates. AtzA<sub>Ps</sub> showed substantially less activity than AtzA<sub>WT</sub> with all substrates tested. The data for AtzA<sub>WT</sub> are consistent with previous reports (Topp *et al.*, 2000a; Shapir *et al.*, 2005a).

The effect of each of the three amino acid differences between AtzA<sub>WT</sub> and AtzA<sub>Ch</sub> on atrazine and simazine specificities was then determined by introducing each of the AtzA<sub>Ch</sub> residues individually and in pairwise combinations into the AtzA<sub>WT</sub> background (Fig. C-6). Each of the substitutions affected activity, albeit none of the effects were large. The major activity-enhancing effects were a 1.3 fold increase in specificity for simazine by A170T, a 1.6 fold increase in simazine activity by A296T, and a 1.7 fold increase in simazine activity by the combination of A170T and A296T. Intriguingly there was actually also a 1.4 fold reduction in specificity for atrazine due to V92L.

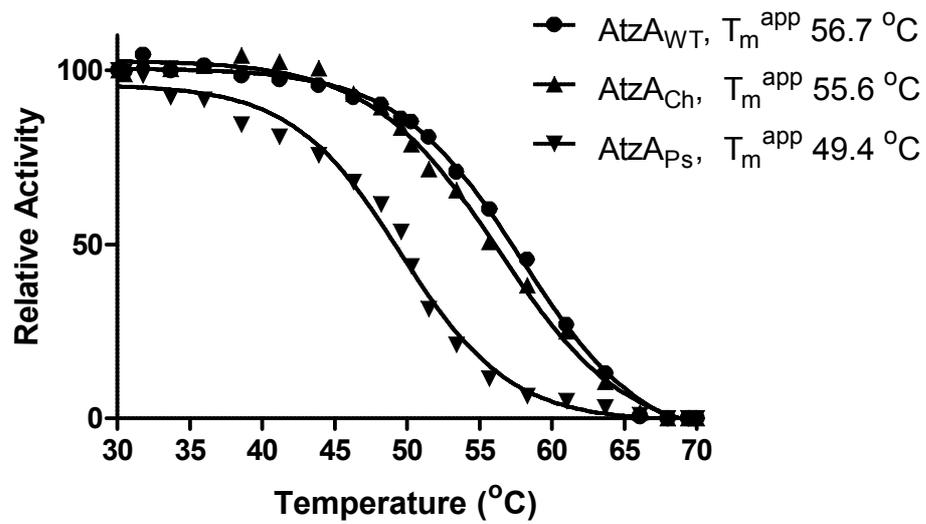


Figure C-7 : percent activity (with 100  $\mu\text{M}$  simazine) remaining after incubating AtzAWT, AtzACh and AtzAPs for 10 min at temperatures ranging from 30  $^{\circ}\text{C}$  – 70  $^{\circ}\text{C}$ .

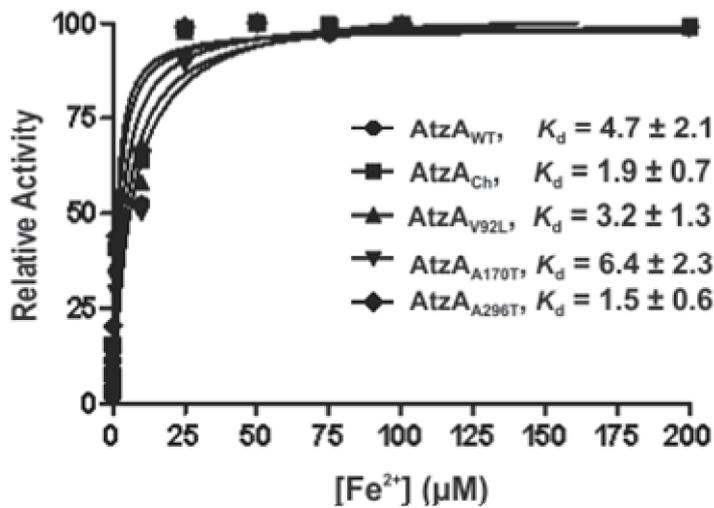


Figure C-8 : relative activities of apoenzymes of AtzAWT, AtzACh and the variants bearing the individual amino acid differences between them after titration by  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### 4.4 Physical properties of AtzAPs and AtzACh

Thermostability data (Fig C-7) showed no significant difference in  $T_m^{app}$  for AtzA<sub>WT</sub> ( $56.7^\circ\text{C} \pm 2.7^\circ\text{C}$ ) and AtzA<sub>Ch</sub> ( $55.6^\circ\text{C} \pm 2.6^\circ\text{C}$ ) but the  $T_m^{app}$  for AtzA<sub>Ps</sub> ( $49.4^\circ\text{C} \pm 2.5^\circ\text{C}$ ) was about  $6^\circ\text{C}$  lower.

Given the proximity of the A296V substitution to the metal binding histidine residues (Section 4.3.2), the dissociation constants ( $K_d$ ) for  $\text{Fe}^{2+}$  were also determined for the AtzA<sub>WT</sub> and AtzA<sub>Ch</sub> enzymes and the variants bearing the individual amino acid differences between them (Fig. C.8). The  $K_d$  of AtzA<sub>WT</sub> for  $\text{Fe}^{2+}$  was estimated at  $4.7 \pm 2.1 \mu\text{M}$ , whereas the  $K_d$  for AtzA<sub>Ch</sub> was found to be approximately 2.5 fold lower ( $1.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ). The values for the variants bearing the V92L and A170T substitutions were essentially the same as that for AtzA<sub>WT</sub> while the value for the variant with A296T was almost identical to that for AtzA<sub>Ch</sub>. This suggests that the A296T substitution is responsible for the enhanced iron-binding affinity of AtzA<sub>Ch</sub>.

### 5. Discussion

#### 5.1 Effects of the substitutions

All four of the amino acid differences distinguishing AtzA<sub>WT</sub>, AtzA<sub>Ch</sub> and AtzA<sub>Ps</sub> have been shown to affect the function of the enzyme. The effects include changes in specificity for atrazine and simazine and differences in thermal stability and dissociation constant for the active-site metal. The effects of the individual amino acid substitutions cannot be interpreted in precise mechanistic terms without a crystal structure. Nevertheless, the homology model allows general structure-function inferences to be made for three of the four substitutions.

The A296T substitution in AtzA<sub>Ch</sub> improves both the  $K_d$  of AtzA for  $\text{Fe}^{2+}$  and the specificity of the enzyme towards simazine. The alanine at position 296 is located between the metal-binding histidine residues of AtzA<sub>WT</sub>, and is likely to be in physical contact with at least one of them. The side chain of alanine occupies a volume of  $88.6 \text{ \AA}^3$ , whilst that of threonine is slightly larger, at  $116.1 \text{ \AA}^3$  (Zamyatnin, 1972). Substituting an alanine at position 296 for the bulkier threonine could change the conformation of at least one metal-binding histidine and therefore affect the geometric relationship between the  $\text{Fe}^{2+}$ -binding ligands. This in turn may change the orientation/positioning of the substrate in the active site, increasing the specificity of the enzyme for simazine. Interestingly, this substitution was not observed in all of the *Chelatobacter* AtzAs, suggesting that there are two distinct populations of *atzA* genes in the isolated *Chelatobacter*



strain : those with the A296T substitution, and those without. A variety of soil characteristics could limit the availability of  $\text{Fe}^{2+}$ , including the pH, redox status, iron concentration, and counter ion chemistry (e.g. iron phosphates are insoluble and unavailable). Such differences in soil chemistry may be sufficient to provide a selection pressure for a reduced  $K_d$  for  $\text{Fe}^{2+}$  based upon its availability.

The V92L substitution in  $\text{AtzA}_{\text{Ch}}$  reduces the enzyme's specificity for both atrazine and simazine. It is likely that the V92L substitution effects binding of both substrates by altering the conformation of the active site or the position of the substrates within the active site. The side-chain volume of leucine is  $\sim 27 \text{ \AA}^3$  greater than that of valine (Zamyatnin, 1972), which might be an important factor in terms of protein conformational change or steric hindrance with one of the alkyl side-chains of the substrates. The substitutions at positions 92 and 296 appear to confer their effects on the substrate specificity of  $\text{AtzA}$  independently of each other, which is consistent with their locations relatively distant from each other in the model of the active site.

M155 is located in the active site of  $\text{AtzA}_{\text{WT}}$  and provides a hydrophobic interaction with the aromatic ring of the substrate. Substitution with valine in  $\text{AtzA}_{\text{Ps}}$  may compromise or abolish this interaction and reduce specificity. Replacement of the large methionine (side-chain volume =  $162.9 \text{ \AA}^3$ ) with the smaller valine (side-chain volume =  $140 \text{ \AA}^3$ ) also results in a  $\sim 6^\circ\text{C}$  reduction in  $T_m^{\text{app}}$ . It may be that the interaction of M155 with neighbouring hydrophobic amino acids is an important structural feature, and disrupting these interactions has a substantial destabilising effect.

The location of the fourth substitution, the A170T substitution in  $\text{AtzA}_{\text{Ch}}$ , is not known because it could not be accurately modelled (Scott *et al.*, 2009). This substitution increases the specificity of the enzyme towards simazine whilst reducing slightly the specificity of the enzyme towards atrazine. This could imply that this amino acid also lies near the active site cavity of  $\text{AtzA}$ .

## 5.2 Evolutionary considerations

$\text{atzA}_{\text{Ps}}$  has evolved in a laboratory population of *Pseudomonas* maintained in laboratory conditions on mineral salt medium added with high concentrations of atrazine as sole nitrogen source for at least twelve years, during which time a single substitution, M155V, has become fixed. It seems unlikely that  $\text{atzA}_{\text{Ps}}$  is evolving neutrally because a number of synonymous and non-synonymous point mutations should have accumulated in that time in the absence of any selective constraints and M155V is the only mutation of any sort that was found. The high abundance of atrazine may have relaxed the selection pressure for a highly efficient atrazine dechlorinase, which could be



permissive of the dramatically reduced specificity of the M155V containing enzyme for all triazine substrates tested herein. That only the mutation conferring the M155V substitution is present in this strain suggests that there is a counter selection for the activity of this enzyme. There are in fact many other cellular functions that an enzyme with promiscuous activities with heterocycles (such as AtzA<sub>Ps</sub>) might impact on, and potentially be recruited to. For example, AtzA might bind/transform cellular metabolites such as nucleosides. Such promiscuous activities could provide a suitable counter selection for the activity of this enzyme. The M155V mutation is also associated with a significant loss of thermal stability for the enzyme, which, given the constant, mesophilic culture conditions (28°C), is also unsurprising.

The use of triazine herbicides has been banned in Europe since 2003. The three amino acid substitutions that distinguish AtzA<sub>Ch</sub> (collected in 2000) from the original AtzA<sub>WT</sub> (collected in 1995) should at least in part reflect selection for more efficient atrazine degradation. Selective pressure for the efficient use of the *s*-triazine herbicides would have been in effect when these bacteria were isolated because of the relatively high load of the herbicides in the soil and their high value to the microbiota as a rich source of nitrogen (five atoms per molecule; see Fig. C-6). Consistent with this proposition, AtzA<sub>Ch</sub> does show higher specificity for simazine than AtzA<sub>WT</sub>. The increased specificity for simazine may be a result of low level contamination of technical formulations of atrazine with simazine, which accounts for up to 0.5% of the mass of technical grade atrazine [Pan – p 171-178 In IAEA report]. Because of the relatively low abundance of simazine, an increase in  $K_M$  for this substrate would be particularly beneficial, which would in turn increase the specificity constant of the enzyme. Also possibly relevant to its ability to scavenge triazine residues, AtzA<sub>Ch</sub> also showed stronger affinity for metal ions required for activity in the active site. Unlike the situation for AtzA<sub>Ps</sub> there was no significant drop in thermal stability, which is consistent with the ongoing need for the host to operate effectively in the open environment. However, as with *atzA<sub>Ch</sub>*, there was no accumulation of either synonymous or inactivating non-synonymous mutations in *atzA<sub>Ps</sub>*.

At least one of the three amino acid substitutions in AtzA<sub>Ch</sub> seems to be causally involved in the biochemical differences from AtzA<sub>WT</sub>. Specifically A296T made a major contribution to the increased specific activities seen in AtzA<sub>Ch</sub> for simazine (and to a lesser extent atrazine) and A170T also made some contribution to the increase for simazine, albeit not atrazine. The stronger metal binding also appears to be largely due to A296T. Anomalously however, V92L has a detrimental effect on specificities for both atrazine and simazine and does not appear to contribute to the stronger metal binding either. It seems unlikely that V92L is selectively neutral,



given its effects on enzyme activities and its location in the interior of the molecule near the active site. It may therefore contribute to some other selectively favoured property of the protein. Notably this substitution is one of the eight previously found to distinguish AtzA and TriA and it was also found to improve activity for melamine in intermediate forms of the enzyme between AtzA and TriA (Seffernick *et al.*, 2001).

In different ways, both the AtzA<sub>Ch</sub> and AtzA<sub>Ps</sub> results presented here therefore support the evidence from the AtzA/TriA comparisons that the AtzA/TriA lineage is a versatile platform for the evolution of new biochemical functions.

## 6. Conclusion

Bacteria, later identified as strains of *Chelatobacter heintzii*, capable of degrading triazine herbicides were isolated from agricultural soils cropped with corn, regularly treated with atrazine and located at different places in France. The AtzA gene/enzyme systems from these strains were isolated and characterized and found to be identical to each other. Concurrently, the AtzA gene/enzyme system from *Pseudomonas* sp. ADP strain mse, which had been maintained in Dr. Fabrice Martin Laurent's laboratory under atrazine selection pressure, was also isolated and characterized. The *C. heintzii* AtzA (AtzA<sub>Ch</sub>) differed at three positions (V92L, A170T and A296T) from the wild-type enzyme (AtzA<sub>WT</sub>), whereas the AtzA from *Pseudomonas* sp. ADP strain mse (AtzA<sub>Ps</sub>) varied at only one position (M155V). The enzymes were over expressed, purified and characterized. AtzA<sub>Ch</sub> had an increased specificity for simazine, resulting from the A170T and A296T substitutions, and a slightly decreased specificity for atrazine. The A296T substitution also enhanced the enzymes capacity to bind Fe<sup>2+</sup>. The V92L substitution in AtzA<sub>Ch</sub> decreased the enzyme's specificity for both atrazine and simazine. It is unclear if the selection pressure that AtzA<sub>Ch</sub> has responded to was simazine utilisation, iron availability or another factor. AtzA<sub>Ps</sub> was considerably less stable than AtzA<sub>WT</sub> and possessed much lower triazine chlorohydrolase activity. We hypothesised that AtzA has a negative impact on the metabolic efficiency of the *Pseudomonad*, and that this constitutes a selection pressure for the loss of AtzA activity. Where a selection pressure is exerted for the presence of AtzA activity (i.e. when using atrazine as a nitrogen source) then there is a trade-off between metabolic efficiency and the capacity to catabolise triazine compounds.



**AXE 2 :**



## **AXE 2 : APPROCHE D'ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE *IN VITRO* : évolution du potentiel génétique de population microbienne dégradante soumise à la pression de sélection de l'atrazine et de l'acide cyanurique.**

### **Préambule**

Les travaux menés par mon équipe d'accueil ont permis de montrer que les populations dégradant l'atrazine présentaient une extraordinaire plasticité génétique ; le transfert horizontal de gènes (HGT) par conjugaison bactérienne permet l'échange de plasmides cataboliques (Devers *et al.* 2005) tandis que la mobilisation des gènes de dégradation par des éléments d'insertion permet de diversifier leur localisation génomique (Devers *et al.* 2007a). L'importance écologique de ces 2 processus contribuant à disperser la fonction de dégradation au sein de la communauté microbienne a été démontrée par l'étude de souches dégradantes isolées de sols agricoles collectés dans différentes localisation géographiques (Devers *et al.* 2007b). Le moteur évolutif de la communauté dégradante semble résider dans l'exposition à l'atrazine, qui représente une source d'azote et d'énergie permettant le développement des populations dégradantes. Ainsi, une expérience d'écologie évolutive conduite sous la pression de sélection atrazine a clairement montré qu'en réponse à ce traitement, une population nouvellement évoluée, présentant des capacités dégradantes plus élevées que la population originelle, apparaissait et que le gain de fitness observé reposait sur la duplication du gène *atzB* par transposition répllicative (Devers *et al.* 2008).

Bien que la preuve de la plasticité génétique de la communauté microbienne dégradant l'atrazine ait pu être démontrée plusieurs questions restent en suspens. Quelle est la stabilité de la population microbienne dégradante ? Quelle est la tendance évolutive de population microbienne dégradante maintenue sous une pression de sélection atrazine ? La première question interroge sur le coût du maintien de la fonction de dégradation de l'atrazine dans des conditions défavorables. La seconde pose la question de la fixation d'une fonction accessoire dans le fond génétique d'une souche conduisant à une forme de spéciation métabolique. Afin d'explorer ces questions, j'ai mis en place deux expériences évolutives : (i) l'une défavorable au maintien de la voie de dégradation dans son entièreté et (ii) l'autre favorisant la sélection de populations performantes pour la dégradation de l'atrazine.



## Objectifs

### a) Expansion-réduction de la voie de dégradation de l'atrazine chez *Pseudomonas* sp. ADP

J'ai souhaité, dans cette première partie, estimer le coût du maintien de la fonction de dégradation de l'atrazine et évaluer l'importance de la plasticité génétique dans ce processus. L'hypothèse testée est qu'en absence de la pression de sélection exercée par l'atrazine, les gènes de dégradation peuvent représenter un fardeau génétique nuisant à leur compétitivité. La voie haute de la minéralisation de l'atrazine impliquant les gènes *atzABC* exprimés à un niveau basal (non régulé transcriptionnellement) et entourés d'éléments d'insertion, représente dans ce contexte une cible intéressante contrairement à la voie basse qui implique les gènes *atzDEF* dont l'expression est placée sous la régulation du facteur transcriptionnel *atzR*. Dans ce contexte, j'ai mis en place une expérimentation évolutive consistant à appliquer une pression de sélection sur la voie basse de la minéralisation de l'atrazine en utilisant l'acide cyanurique comme seule source d'azote. Des cultures répétées de *Pseudomonas* sp. ADP ont été conduites dans ces conditions. Après environ 120 générations, l'analyse des capacités dégradantes de la population microbienne a été évaluée. Elle a montré que cette population n'était plus capable de dégrader l'atrazine et que ces aptitudes à croître sur l'acide cyanurique étaient améliorées. Les réarrangements génétiques ont été évalués en (i) caractérisant la capacité de dégradation par criblage PCR des gènes *atz*, (ii) étudiant la structure plasmidique par Southern blot et plasmide Eckhardt, (iii) amplifiant et séquençant une partie du plasmide pADP1.

### b) Amélioration de la compétitivité de la population dégradante *Pseudomonas* sp. ADP

L'expérience évolutive conduite par Devers *et al.* (2008) avait conduit à montrer la capacité de la population dégradante *Pseudomonas* sp. ADP à améliorer sa compétitivité vis-à-vis de la dégradation de l'atrazine pour sa croissance dans des conditions favorables. Cette expérience avait été menée par cultures répétées sur un milieu minéral additionné d'atrazine à 30 mg L<sup>-1</sup>. J'ai voulu évaluer l'impact d'une pression de sélection plus élevée sur les capacités évolutives de *Pseudomonas* sp. ADP T34. Pour ce faire, la population T34 a été cultivée de manière répétée sur un milieu minéral contenant 100 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine. Après environ 1000 générations, les paramètres phénotypiques et génétiques de la population *Pseudomonas* sp. ADP ont été évalués avec les outils et méthodes décrits précédemment.



**ARTICLE : Publié dans GENE : *In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure : Evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid pADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes.**

*In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure : evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid pADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes.

F. Changey, M. Devers-Lamrani, N. Rouard and F. Martin-Laurent\*

INRA, Université de Bourgogne, Microbiologie du Sol et de l'Environnement, 17 rue Sully 21065 Dijon Cedex.

\*Corresponding authors : Fabrice Martin-Laurent, Fax : 33 3 8069 3224, Email : [fabrice.martin@dijon.inra.fr](mailto:fabrice.martin@dijon.inra.fr).

## 1. Abstract

The adaptation of microorganisms to pesticide biodegradation relies on the recruitment of catabolic genes by horizontal gene transfer and homologous recombination mediated by insertion sequences (IS). This environment-friendly function is maintained in the degrading population but it has a cost which could diminish its fitness. The loss of genes in the course of evolution being a major mechanism of ecological specialization, we mimicked evolution *in vitro* by sub-culturing the atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. ADP in a liquid medium containing cyanuric acid as the sole source of nitrogen. After 120 generations, a new population evolved, which replaced the original one. This new population grew faster on cyanuric acid but showed a similar cyanuric acid degrading ability. Plasmid profiles and Southern blot analyses revealed the deletion of a 47 kb region from pADP1 containing the *atzABC* genes coding for the enzymes that turn atrazine into cyanuric acid. Long PCR and sequencing analyses revealed that this deletion resulted from a homologous recombination between two direct repeats of a 110-bp, identical to *ISPps1* of *Pseudomonas buttiensis*, flanking the deleted 47 kb region. The loss of a region containing three functional genes constitutively expressed thereby constituting a genetic burden under cyanuric acid selection pressure was responsible for the gain in fitness of the new population.



It highlights the IS-mediated plasticity of the pesticide-degrading potential and shows that IS not only favours the expansion of the degrading genetic potential thanks to dispersion and duplication events but also contribute to its reduction thanks to deletion events.

*Keywords* experimental evolution; adaptation; molecular evolution; cyanuric acid; genetic plasticity; *Pseudomonas* sp. ADP.

## 2. Introduction

In the course of their evolution mainly driven by environmental stresses, bacteria have elaborated a wide range of physiological responses to survive in different ecosystems. They also use a large set of genotypic variations to face environmental changes. Microbial genomes are indeed characterized by a tremendous genetic plasticity (Arber, 1993) which allows them to acquire new genes by horizontal gene transfer (HGT) through different processes on the one hand, and, to lose preexisting genes by different processes such as mutation or deletion on the other hand. Horizontally acquired genetic material ranges from single genes to complete genomic islets that give additional functionality to their host populations (Lawrence, 1999). Combined with short generation times and large numbers, genetic plasticity offers bacterial populations a tremendous adaptation potential which compensates for the absence of sexual reproduction. Genomic changes, which underlie the evolutionary adaptation of bacterial populations to their environment, are not necessarily beneficial; indeed, several of them may be deleterious and cause cell death. On the contrary, some are favorable, giving a higher fitness to the new population, leading to its selection over the original population, thereby affecting the ecological distribution of bacterial populations (Parnell *et al.*, 2010). However, a specific adaptation leading to the colonization of an ecological niche might be deleterious if environmental conditions happen to change.

The study of bacterial adaptation often deals with new microbial functions which are still in the process of environmental evolution. So far most studies have been carried out about resistance to antibiotics, whose main evolution-driving mechanism is the survival of resistant populations (Mazel and Davies, 1999). Recently we suggested that the adaptation of bacterial populations to pesticide degradation could also provide an interesting model (Devers *et al.*, 2008). In this case, the major factor driving bacterial evolution is the formation of a fully functional catabolic pathway enabling pesticide use as a source of C and energy. In this context, we showed that the herbicide atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) used for 50 years on crops



such as corn represents an interesting model (Devers *et al.*, 2008). It is not easily degraded and is rather mobile (Belluck *et al.*, 1991) thereby contaminating water resources. As a result of regular exposure to this herbicide, bacterial populations able to degrade and use atrazine as a nitrogen and energy source for their growth have been selected and several of them have been isolated and characterized (Mandelbaum *et al.*, 1995; Topp *et al.*, 2000b; Rousseaux *et al.*, 2001; Piutti *et al.*, 2003; Devers *et al.*, 2007). *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995) which harbors the full catabolic pathway made of the *atzA*, *B*, *C*, *D*, *E* and *F* genes located on pADP1, a large self-transmissible plasmid (Martinez *et al.*, 2001), is often used as a model. The early steps of the pathway, made of the *atzA*, *atzB* and *atzC* genes, transform atrazine into cyanuric acid (1,3,5-triazine-2,4,6-triol). These three genes surrounded by IS sequences are detected on different replicons, so they are not yet fixed at a permanent location (Rousseaux *et al.*, 2001). On the contrary, the *atzDEF* genes coding for the enzymes that open the *s*-triazine ring of cyanuric acid are organized in an operon placed under the regulation of the *atzR* transcription factor (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005). Recently, we showed in an evolutionary experiment conducted on *Pseudomonas* sp. ADP maintained under a selection pressure exerted by atrazine that a newly evolved population showing an increased fitness as compared to the initial population was selected after 320 generations (Devers *et al.*, 2008). Further analyses showed that the gain in fitness of the newly evolved population resulted from a gene dosage effect due to the duplication of the *atzB* gene by homologous recombination mediated by IS sequences. Although the study highlights the plasticity of the atrazine-degrading genetic potential, indicating that the atrazine-catabolic genome may expand as a result of selection pressure, it also questioned the maintenance cost of this adaptation in changing environmental conditions. Indeed, several authors suggest that genetic adaptation selected in a given environment might result in a lower fitness toward other environmental conditions (Zinser *et al.*, 2003). Evidence for expansion and reduction of genomes has recently been discovered (Barrick *et al.*, 2009) and adaptive losses of gene activities, leading to an increased fitness under selective conditions have been observed (Furuta *et al.*, 2011; Roth 2011). In addition, several authors suggest a rapid loss of *atz* genes when atrazine-degrading isolates are cultivated on rich media without any atrazine selection pressure, thereby suggesting a propensity of these strains to eliminate the genes that constitute a genetic burden under unfavorable conditions.

In order to assess the dynamics of the atrazine-degrading genetic plasticity under unfavorable conditions, we investigated the evolution processes of *Pseudomonas* sp. ADP populations placed under cyanuric acid selection pressure. We designed an evolutionary experiment in which *Pseudomonas* sp. ADP harboring the plasmid pADP1 was sub-cultured each week in a liquid



mineral salt medium containing cyanuric acid as the sole source of nitrogen. The fitness of the initial and of the final population was assayed and the organization of the atrazine-degrading potential characterized.

### 3. Materials and methods

#### 3.1 Strain and media

The strain used in our experiments was *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995). As previously described by Devers *et al.* 2005, it was maintained on MSA medium containing atrazine (30 mg.l<sup>-1</sup>) as the sole source of nitrogen and citrate (1 g.l<sup>-1</sup>) as a carbon source. *In vitro* evolution was performed with mineral liquid medium containing cyanuric acid (0.5 g.l<sup>-1</sup>) as the sole source of nitrogen (MSCA) and citrate (1 g.l<sup>-1</sup>) as a carbon source. A rich medium (TY) containing 5 g.l<sup>-1</sup> tryptone, 3 g.l<sup>-1</sup> yeast extract and 10 mM CaCl<sub>2</sub>, was used to determine the growth kinetics of the strains. Knapp buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g.l<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g.l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 0,04 g.l<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub> 0,004 g.l<sup>-1</sup>) was used for batch experiments aimed at estimating the cyanuric acid degradation ability of the strains. LB medium (10 g.l<sup>-1</sup> tryptone; yeast extract 5 g.l<sup>-1</sup>; and NaCl 10 g.l<sup>-1</sup> containing 100 µg.mL<sup>-1</sup> ampicillin) was used for cloning PCR amplicons.

#### 3.2 *In vitro* evolution experiment

*Pseudomonas* sp. strain ADP was grown in MSCA liquid medium at 28°C on a shaker at 150 rpm. Each week, the optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) of the culture was estimated by spectrophotometry (Biophotometer, Eppendorf, Germany). An aliquote was collected to perform molecular analyses based on nucleic acid extraction and another one was collected to store the cells at -80°C in 25% glycerol. An aliquote equivalent to an OD<sub>600</sub> of 0.2 was then inoculated to 200 mL of fresh MSCA medium and incubated under the conditions described above. This procedure was repeated for approximately 120 generations. All along the *in vitro* evolution experiment, the purity of the culture was checked by plating the bacterial cells on solid MSCA medium and performing amplified rRNA restriction analysis (ARDRA) as described previously (Devers *et al.*, 2008).

#### 3.3 Growth kinetics

The growth kinetics of the original *Pseudomonas* sp. ADP (ADPO) and newly evolved (ADPE) strains were determined by inoculating an aliquote of the cell culture equivalent to an OD<sub>600</sub> of 0.02 in 100 mL of MSCA or TY medium, in triplicate for each strain and each medium. Cell cultures were incubated at 28 °C on a shaker at 150 rpm. Throughout the 15-hour incubation period, 1 mL aliquotes were regularly collected to measure the OD<sub>600</sub> by spectrophotometry. In



addition, 1 mL aliquotes were regularly collected from cultures grown on MSCA to estimate the amount of cyanuric acid remaining in the culture medium by high performance liquid chromatography (HPLC). Briefly, samples were filtered on 0.2  $\mu\text{m}$  filters, transferred into HPLC vials (32x11.6mm-Cleanpack) and analyzed by an HPLC system (LC Star System®, Varian) equipped with a Microsorb-MV C18 column (length 25 cm, internal diameter 4.6 mm, Varian). The solvent was composed of methanol/ultra pure water (75/25; v/v) delivered at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>. Under these conditions cyanuric acid detected at 225 nm showed a retention time of about 3 min.

To determine the growth parameters of ADPO and ADPE on MSCA medium, the bacterial growth curves were fitted to the modified Gompertz model using SigmaPlot® 6.10 software (Zwietering *et al.*, 1990). The model equation is :  $y = A \cdot \exp\{-\exp[1 + \mu m \cdot \exp(1) \cdot (\lambda - t) / A]\}$  where y is the OD<sub>600nm</sub> (AU); t is the time (h);  $\mu m$  is the maximum specific growth rate (h<sup>-1</sup>); A the maximum OD<sub>600nm</sub> value obtained (AU) and  $\lambda$  lag time (h). The parameters were validated by a Student t test ( $p < 0.005$ ).

As ADPO and ADPE yielded a biphasic growth curve on TY medium, the data could not be fitted into the Gompertz model. As a consequence, their growth rate was estimated by fitting linear regressions on the two phases observed. To compare the growth parameters of ADPO and ADPE, the kinetic parameters were subjected to a single factor analysis of normality and a Kruskal-Wallis test followed by a Fisher procedure ( $p < 0.01$ )

#### 3.4 Cyanuric acid degradation ability of crude cell extracts

The microbial biomass was produced on MSCA and MSA liquid media for strains ADPE and ADPO, respectively. The cells were harvested by centrifugation at 3,300 g for 5 min. Bacterial pellets were washed twice in Knapp buffer. The cell membrane was then disrupted using the following procedure. The bacterial cells were transferred into 15-mL falcon® tubes and 2.2 g of 2.2  $\mu\text{m}$  silica beads were added. Bacterial membranes were disrupted at 6 m sec<sup>-1</sup> for 30 sec in a Fast-prep® Instrument (MP Biomedicals, USA). The silica beads were removed by a short centrifugation and cell extracts were recovered in the supernatant. Crude cell extracts were diluted to 0.1 OD<sub>600</sub> in Knapp buffer with cyanuric acid added at 0.5 g l<sup>-1</sup>. Cell suspensions (n=3 per strain) were incubated at 28°C under agitation (150 rpm). One milliliter aliquotes were regularly collected and analyzed by HPLC as described above to estimate the amount of cyanuric acid remaining in the culture media. These experiments were performed in triplicate and a non-inoculated control was included.

**Table D-I : primers used to perform PCR reactions.**

Target sequence	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing temperature	Reference
<i>atzA</i>	A1F	ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC	60	Devers et al.,2004
	A1r	CAC CCA CCTCAC CAT AGA CC		Devers et al.,2004
<i>atzB</i>	B1 r	CAC CAC TGT GCT GTG GTA GA	60	Devers et al.,2004
	B1f	AGG GTG TTG AGG TGG TGA AC		Devers et al.,2004
<i>atzC</i>	Cf	GCT CAC ATG CAG GTA CTC CA	57	De Souza et al.,1998
	Cr	TCC CCC AAC TAA ATC ACA GC		Devers et al.,2004
<i>atzD</i>	Df	TCC CAC CTG ACA TCA CAA AC	60	Devers et al.,2004
	Dr	GGG TCT CGA GGT TTG ATT G		Devers et al.,2004
<i>atzE</i>	Ef	GAG CCT CTG TCC GTA GAT CG	60	Devers et al.,2004
	Er	GAT GGC GTG TAC CGT TTA CC		Devers et al.,2004
<i>atzF</i>	Ff	ACC AGC CCT TGA ATC ATC AG	57	Devers et al.,2004
	Fr	TAT TGT CCC GAT ACC CAA CG		Devers et al.,2004
<i>atzD</i>	AtzD-f	ATG TAT CAC ATC GAC GTT TT	50	This study
	AtzD-r	CAG TCA TTG CCC GCG CTT AA		This study
<i>atzE</i>	AtzE-f	ATG AAG ACA GTA GAA ATT AT	50	This study
	AtzE-r	TCG CCC GAC TGA AAT GTT AA		This study
<i>atzF</i>	AtzF-f	ATG AAT GAC CGC GCG CCC CA	55	This study
	AtzF-r	CAT ACC TCG CGG CTC AAT AG		This study
pADP1	26932-f	AGT GGG GTG AAG ATC GTC TG	60	This study
	Trbn-r	GTC GCC CTT GTC GTT GCG GA		This study
RNA polymerase promoter	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	58	
	SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG		

### 3.5 Plasmid profile

One millilitre of bacterial culture adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.2 was centrifuged at 14,000 g for 3 min (Eppendorf-5415R, Germany). Plasmid profiles were obtained from the bacterial pellet using Eckhardt's method as modified by Wheatcroft *et al.*, (1990) (Eckhardt, 1978; Wheatcroft *et al.*, 1990). Plasmid sizes were determined by calibration as compared to the relative mobility of standard plasmid : (i) pAT (543 kb, accession number AE007872) and pTi (214 kb, accession number AE007871) harboured by *Agrobacterium tumefaciens* C58, and (ii) a megaplasmid (41500 kb), pRme41 : Tn7 (236 kb) and pRP4 (60 kb, accession number L27758), harbored by a derivative of *Rhizobium meliloti* 41.

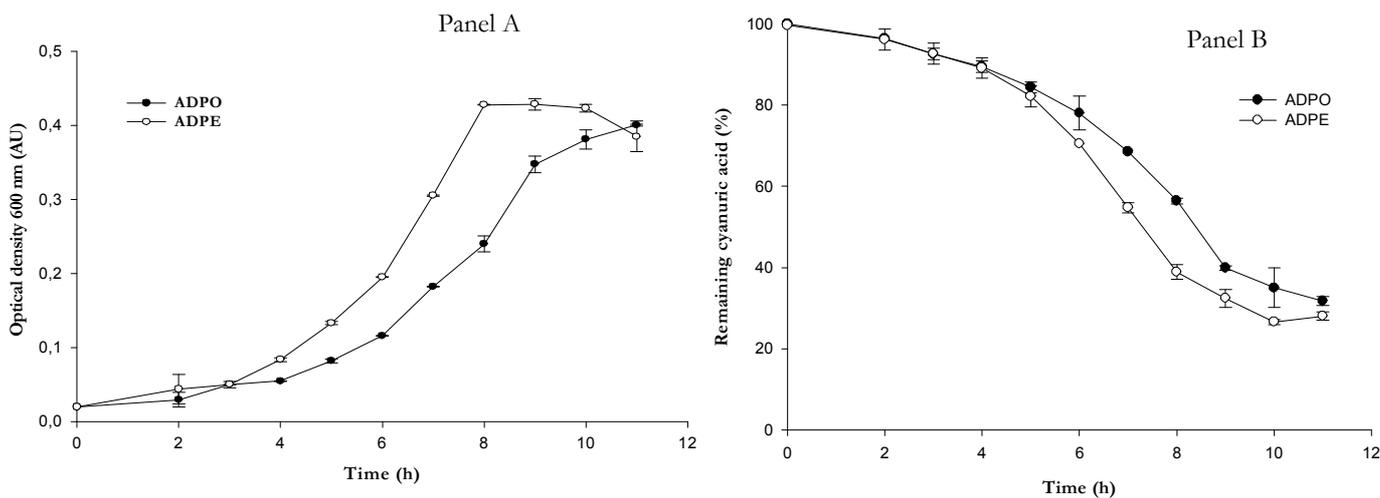
### 3.6 Analysis of the atrazine-degrading genetic potential by PCR

The components of the atrazine-degrading genetic potential of the strains were checked by PCR. *atzA*, *B*, *C*, *D*, *E* and *F* sequences were amplified using specific primer pairs (for primer sequences see Table D-I). PCRs were carried out in a final volume of 25 µl by using 0.2 µM dNTPs, 1 µM of each of the primers and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Q-biogene, France). PCR reactions were carried out in a Personal Mastercycler (Eppendorf, Germany) as follow : 5 min at 95°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at the annealing temperature and 2 min at 72°C, and an additional 10 min at 72°C after the last cycle. The PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (100 µg.l<sup>-1</sup>) (Gibco-BRL, life technologies), and photographed with a CDD camera (Sony, France).

### 3.7 Southern blot analysis

DNA was extracted from 20 mL of ADPO or ADPE bacterial suspension grown on MSA or MSCA medium, respectively, using the Qiagen®Blood and Cell culture DNA Midi Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen®, France). The DNAs were digested in 40 µl final volume containing 200 ng of DNA and 20U of *NruI* or *SmaI* restriction enzymes (Q-biogene, France). After an overnight incubation at 37°C, 20 µl of the digested DNA were separated by electrophoresis in an 0.9% agarose gel overnight at 40 V. The digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker II was used as a DNA ladder (Roche Applied Science®, France).

The DNAs in the gels were transferred under vacuum onto a nylon-membrane (Nytran N-0.45 µm nylon blotting membrane-Whatman®). They were then covalently bound to the membrane by 3 min UV exposure and 1 h incubation at 80°C. They were then hybridized with *ISPps1* and *AtzF* dig-labeled probes. Dig-labeled probes were produced by PCR using specific primer pairs. Hybridization signals were detected under high-stringency conditions as described previously (Devers *et al.*, 2007).



**Fig. D-1 . Panel A :** growth curves of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) *Pseudomonas* sp. ADP populations grown in cyanuric acid mineral salt medium (MSCA). Optical density was recorded at 600 nm on one milliliter aliquots regularly taken from cell cultures (n=3).

**Panel B :** cyanuric acid degradation kinetics of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP measured in cyanuric acid and mineral salt medium (MSCA) growth conditions. The amount of cyanuric acid remaining in the extracellular medium of ADPO (black circle) and ADPE (open circle) cultures was estimated by HPLC (n=3).

**Table D-II :** growth parameters of the ancestor (ADPO) and the newly evolved populations (ADPE) of *Pseudomonas* sp. ADP in MSCA and TY media. For cultures performed on MSAC, the maximum Optical Density (ODmax) value, the maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) and the lag time ( $\lambda$ ) of ADPO and ADPE were determined by fitting the modified Gompertz model to the growth kinetic curves shown in Fig. D-1A. For cultures performed on TY medium biphasic growth curves shown in Fig. D-1B were modeled to compare the growth parameters of ADPO and ADPE. The parameters were subjected to a single factor analysis of normality and a Kruskal-Wallis test followed by a Fisher procedure (MSCA : n=3, TY : n=3, p<0.01) .

		$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )		ODmax (a.u)		$\lambda$ (h)	
		ADPO	ADPE	ADPO	ADPE	ADPO	ADPE
MSAC		0.024 ± 0.001*	0.035 ± 0.008*	0.41 ± 0.009	0.40 ± 0.007	5.9*	3.33*
TY	1st phase	0.05 ± 0.01*	0.14 ± 0.01*	-	-	-	-
	2nd phase	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.02	-	-	-	-

\*For each parameter values followed by an asterisk are significantly different

### 3.8 Long PCR

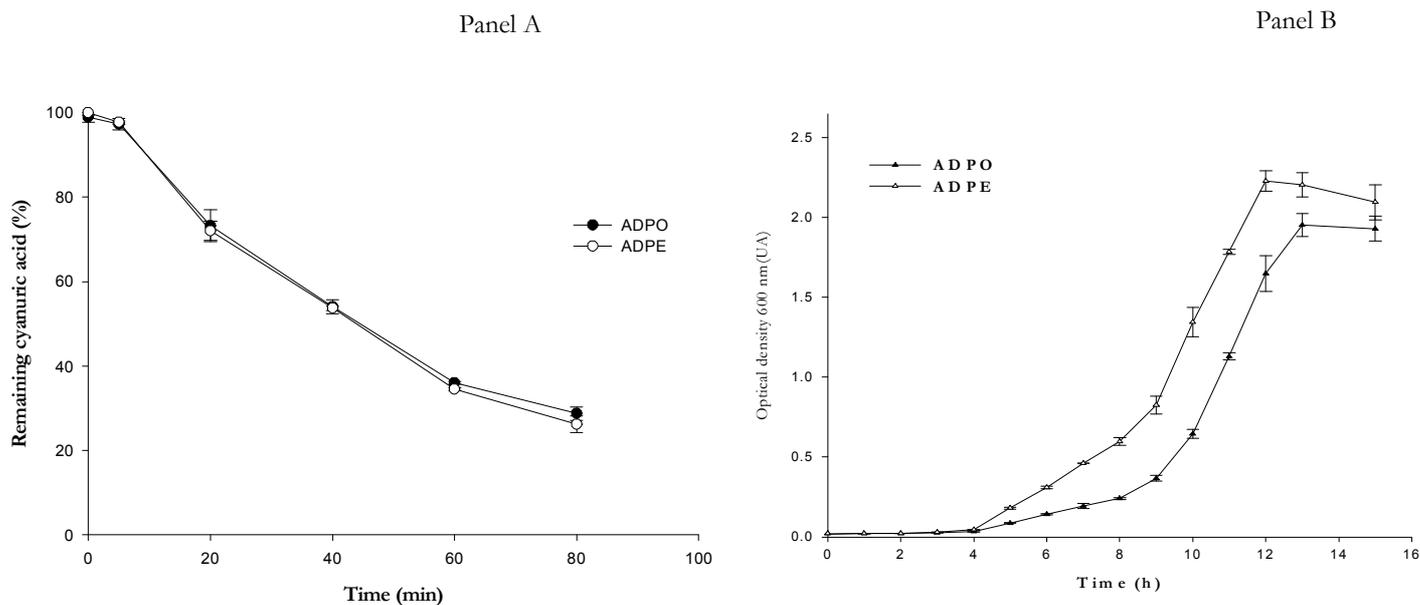
Long PCR was performed using the Expand Long PCR System (Roche Applied Science®, Germany). It was conducted in a final volume of 50 µl containing 500 ng of extracted DNA, 3.75 U of DNA polymerase, 2 mM dNTPs, 0.3 µM 26943F and *trbNr* primers (for primer sequences see Table D-I), 5 µl of buffer and 3 µl of ultra-pure water. DNA amplifications were carried out in a PTC 200 gradient cyler (MJ Research, Waltham, MA, USA) as follow : 2 min at 94°C, 30 cycles of 10 min at 94°C, 30 s at 57°C and 12 min at 68°C, plus an additional 7 min at 68°C. The elongation time was increased by 20 s for each cycle from cycle 11 to cycle 30. A 40 µl aliquote was then immediately purified by adding one volume of cold isopropanol and 2 µl of glycogen and incubating for 1 h at -20°C. The sample was then centrifuged at 13,500 g at 4°C for 40 min. The DNA pellet was then washed with cold ethanol 70%, air-dried, and resuspended in 50 µl of ultra-pure water. The purified PCR products were then separated by electrophoresis on 1% agarose gels to control their size and quality.

### 3.9 Cloning and sequencing of *atzD* and long PCR amplicons

Purified *atzD* and long PCR amplicons were ligated into the pGEMT-EasyII vector and cloned in *Escherichia coli* JM109 according to the manufacturer's recommendations (Promega®, France). Putative white-coloured recombinant clones were checked by PCR using the SP6 and T7 primers as described previously. Confirmed recombinant clones were grown on LB medium containing ampicillin and recombinant plasmids were purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®, France). Cloned *atzD* amplicons were sequenced by Beckman Coulter Genomics®. The resulting sequences were analyzed with Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) and Lasergene SeqMan Pro software (DNA Star®). They were deposited in the GenBank database under the following accession number : *atzD* Bankit 1458606 and pADP1 E long PCR product Bankit 1458622.

## 4. Results

4.1 Evolution of growth and of cyanuric acid degrading capabilities of *Pseudomonas* sp. ADP  
The growth parameters of the initial (ADPO) and final (ADPE) bacterial populations obtained after 120 generations of *Pseudomonas* sp. ADP in MSCA medium containing cyanuric acid as the sole nitrogen source were estimated (Fig. D-1, panel A). The growth kinetics presented shows that ADPE grew faster on MSCA than ADPO. The growth parameters presented in Table D-II show statistically significant differences between ADPO and ADPE : the  $\mu_{\max}$  (0.035 h<sup>-1</sup>) of



**Fig. D-2 .Panel A :** cyanuric acid degradation kinetics of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP estimated from crude cell extracts prepared from atrazine mineral salt medium (MSA) or cyanuric acid mineral salt medium MSCA, respectively, incubated in Knapp buffer. The amount of cyanuric acid remaining in the extracellular medium of ADPO (black circle) and ADPE (open circle) crude cell extracts was estimated by HPLC (n=3).

**Panel B :** growth curves of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) *Pseudomonas* sp. ADP populations cultivated in a rich medium. Optical density was recorded at 600 nm on one milliliter aliquots regularly taken from cell cultures (n=3).

ADPE, the newly evolved population, was higher than that of the initial population ( $0.024 \text{ h}^{-1}$ ) ( $n=3, p<0.01$ ).

Concomitantly, the ability of ADPO and ADPE populations grown on MSCA to degrade cyanuric acid was estimated by monitoring the amount of cyanuric acid remaining in the culture medium by HPLC (Fig. D-1, panel B). In accordance with the growth kinetics shown above, the final population degraded 50% of the cyanuric acid in the MSCA medium within 7.5 h whereas the initial population required 8.7 h. In addition, the rate of cyanuric acid degradation of the ADPE population ( $13.75 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ ) was significantly higher than that of the initial population ( $8.75 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ ) ( $n=3, p<0.01$ ). In order to check if the gain in fitness of ADPE was driven by an increased degrading ability, cyanuric acid degradation by these two populations was monitored in crude cell extracts prepared in Knapp buffer added with cyanuric acid (Fig D-2. Panel A). We showed that the ability of ADPO and ADPE populations was similar in these resting cell experiments, suggesting that the gain in fitness was not directly linked to the degrading ability.

The growth of these two populations was monitored on a rich medium to check if the gain in fitness of the newly evolved population could be due to growth performances. The growth kinetics presented in Fig. D-2 (panel B) shows that the two populations had a biphasic growth curve. After a lag phase of four hours, ADPE grew faster than ADPO with significantly different maximum growth rates of  $0.14 \text{ h}^{-1}$  and  $0.05 \text{ h}^{-1}$ , respectively ( $n=3, p<0.01$ ). After eight hours' incubation, the growth curves of ADPO and ADPE showed similar shapes. This observation was further confirmed by the estimation of the growth parameters which were not statistically different (Table D-II).

#### 4.2 Evidence for DNA rearrangement

The plasmid DNA of the initial and newly evolved *Pseudomonas* sp. ADP populations was analyzed to search for a possible explanation for the gain in fitness observed for the ADPE population selected on MSCA medium during the *in vitro* evolution experiment. The plasmid profiles shown in Fig. D-3 (panel C) revealed that the size of plasmid pADP1 which bears the *atzABCDEF* genes averaged 109 kb in ADPO but was reduced to 62 kb in the newly evolved population (i. e. a deletion of approximately 47 kb). In order to check if the atrazine-degrading genetic potential was affected by this deletion, the *atz* gene composition was monitored in ADPO and ADPE by PCR targeting the *atzA, B, C, D, E* and *F* genes. ADPO yielded PCR products for

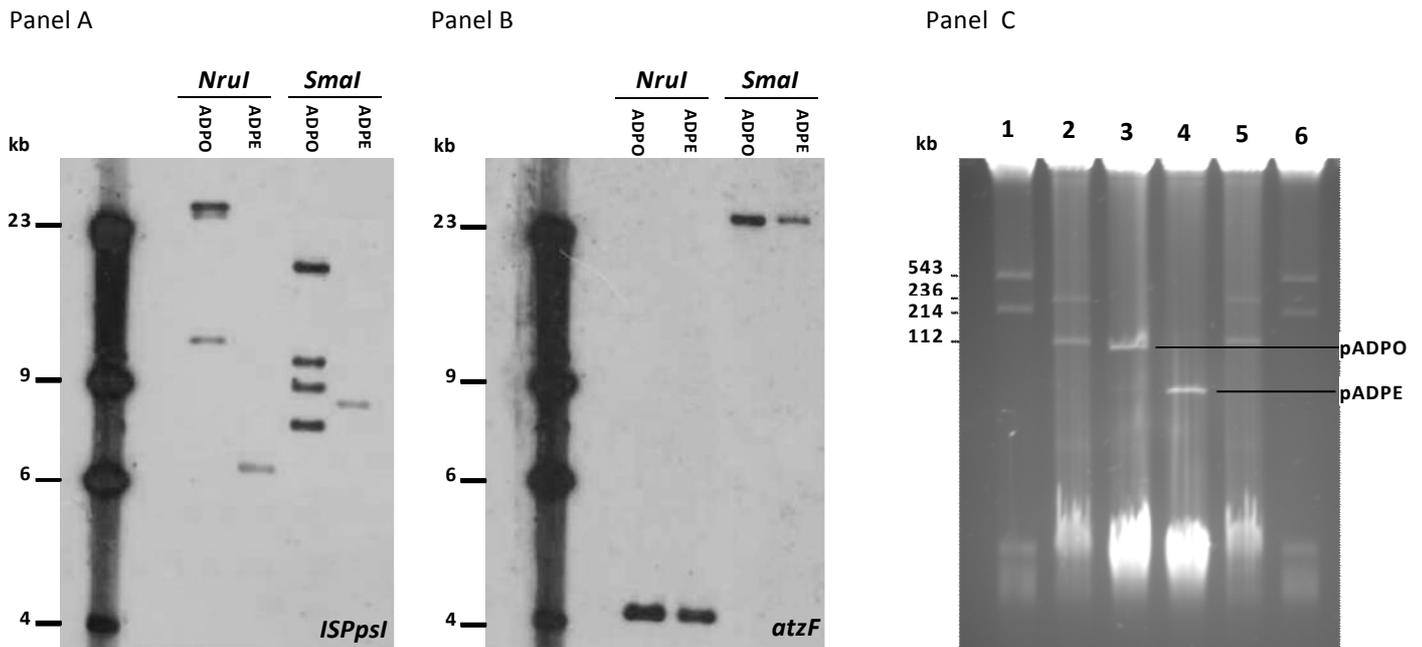


Fig. D-3 :

Panels A and B : southern blot hybridization of the genomic DNA of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP. Genomic DNA was digested with either *NruI* or *SmaI* and hybridized with *ISPps1* (Panel A) or *atzF* (Panel B). DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled was loaded on the left-hand side of the gel. The sizes of the bands of the molecular weight ladder are indicated in kilobases (kb).

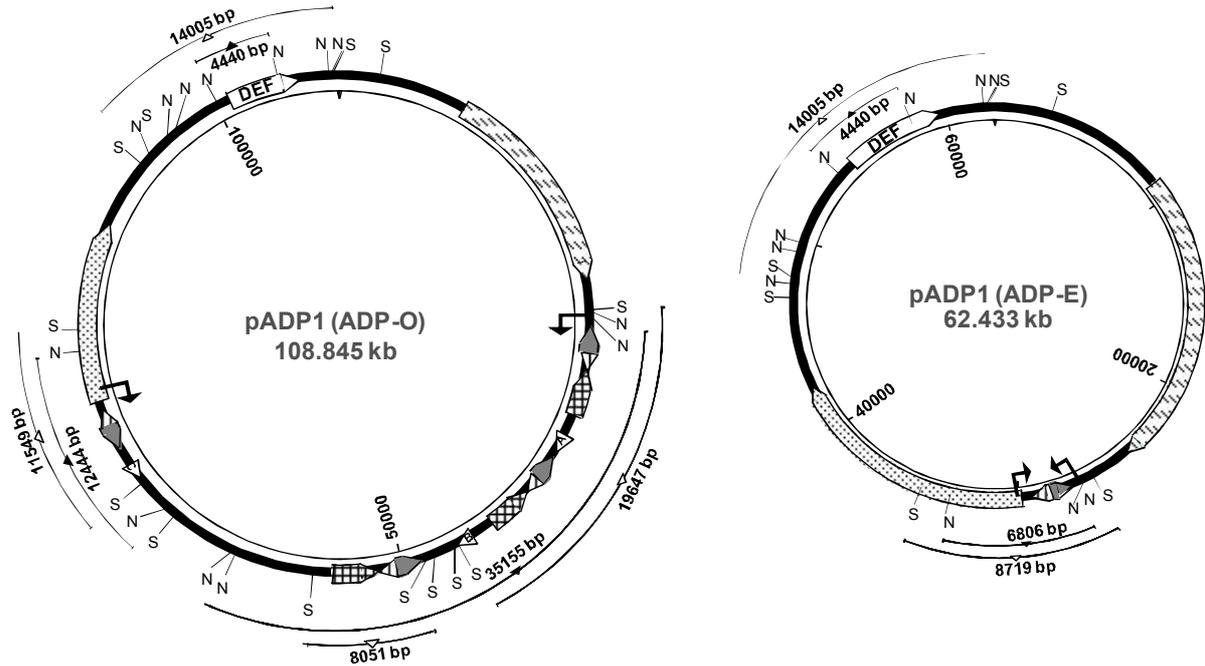
Panel C : plasmid profiles of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP. The plasmid of ADPO is shown in line 3 and the plasmid of ADPE in line 4. The plasmids of known strains were used as molecular weight markers. Lines 1 and 6 : *Agrobacterium tumefaciens* C58 pAT (543 kb, accession number AE007872) and pTi (214 kb, accession number AE007871). Lines 2 and 5: a derivative of *Rhizobium meliloti* 41 (GMI 328) showing a mega plasmid (>1500 kb), pRem41a::Tn7 and pRP4 with sizes of 236 and 112 kb, respectively. The sizes of the different plasmids are indicated in kilobases kb on the left-hand side of the gel.

all the *atz* genes. By contrast, ADPE yielded only amplicons for *atzD*, *E* and *F*, suggesting the loss of the *atzA*, *B* and *C* genes for this population (data not shown).

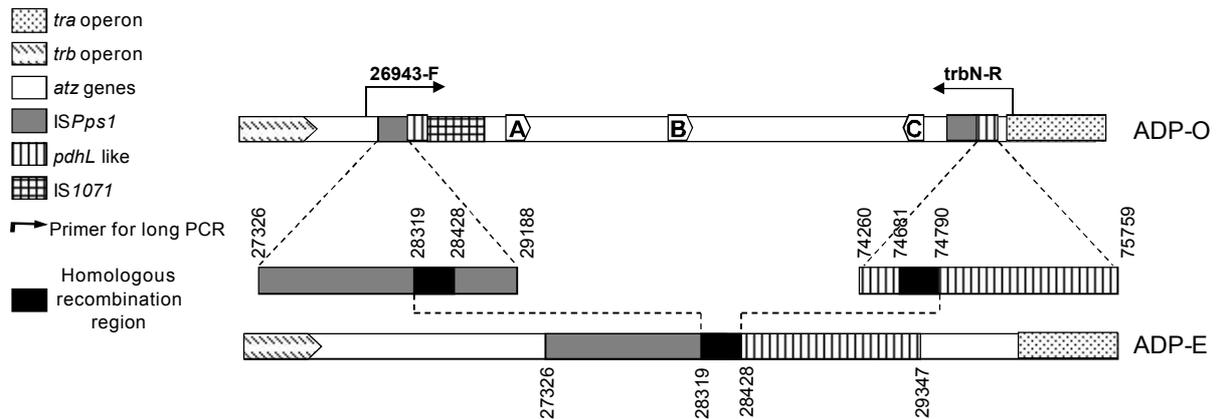
In order to describe the deletion, Southern blot analyses were performed with the genomic DNAs extracted from ADPO and ADPE, digested either with *NruI* or *SmaI* restriction enzymes, and hybridized with *atzF* or *ISPps1* probes targeting the *atzDEF* and the *atzABC* regions, respectively (Fig. D-3, panels A and B). ADPO and ADPE showed similar hybridization profiles with the *atzF* probe, hybridizing a band of approximately 25.4 kb with *SmaI* and a 4.3-kb band with *NruI* (Fig. D-3 panel B). For *NruI* the band observed with the *atzF* probe is in agreement with the size estimated by the pADP1 sequence *in silico* digestion, i.e. 4.4 kb. For *SmaI* the band observed in Southern blot showed a size higher than expected from the *in silico* map (i.e. 25.4 kb instead of 14 kb, respectively). This discrepancy was observed for both populations as well as for the ancestor *Pseudomonas* sp. ADP strain available in our laboratory (data not shown) indicating that it diverged from the reference pADP1 sequence (GenBank accession number U66917). However, ADPO and ADPE showed different hybridization profiles with the *ISPps1* probe (Fig. D-3 panel A). For the initial population, we found that with *NruI*, the *ISPps1* probe hybridized on two bands of approximately 24.6 and 11.6 kb (Fig. D-3, panel A). This profile is only partially in agreement with the *in silico* digestion of pADP1 (respectively 35 155 and 12 444 bp) shown in Fig. D-4 (panel A). This discrepancy was also observed for the *Pseudomonas* sp. ADP strain available in our laboratory (data not shown) indicating that it diverged from the reference pADP1 sequence (GenBank accession number U66917). With *SmaI*, the *ISPps1* probe hybridized on four bands of 18.8 kb, 10.2 kb, 8.9 kb and 7.6 kb (Fig. D-3, panel A). These results are partly in agreement with the *in silico* map of pADP1 showing only three bands of 19 647 bp, 11 549 bp and 8 051 bp (Fig. D-4, panel A). For the final population, the *ISPps1* probe gave a different hybridization profile from that of the initial population. With the *NruI* restriction enzyme, only one band of approximately 6.7 kb gave a signal and with *SmaI*, only one band of approximately 8.2 kb gave a signal for the ADPE population. These results suggest that a deletion occurred on pADP1 in the region containing the four copies of the *ISPps1* and the *atzA*, *B* and *C* genes as a result of the *in vitro* evolution carried out by exerting a cyanuric acid selection pressure.

In order to further study the deletion event that had occurred in the newly evolved population, 26943F and *trbN*R primers targeting the *traC* to *trbN* regions surrounding the deleted region were designed (Fig. D-4, panel B). Long PCR performed on ADPE genomic DNA with this primer pair yielded an approximately 3-kb long amplicon. The sequence of the amplicon showed a sequence of 1 486 bp with homology to *traC* and to *ISPps1* present on pADP1 on its left side from nucleotide 26 943 to nucleotide 28 428, and a sequence of 1942 bp showing homology to

**Panel A**



**Panel B**



**Fig. D-4 :**

**Panels A :** In silico maps of pADP1 from original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations. *SmaI* (S) and *NruI* (N) restriction sites are shown as well as restriction fragments hybridized by *atzF* and *ISPpsI* probes. *atz A, B, C, D, E* and *F* genes as well as *IS1071*, *ISPps1*, *pdhL*-like region, *trbN* and *traC* genes are shown.

**Panel B :** Genomic organization of the pADP1 region in the original *Pseudomonas* sp. population (ADPO) delimited by *traC* and *trbN* genes (79 918bp) and focus on the two regions involved in the deletion by homologous recombination; *ISPps1* on the left side and *pdhL*-like region on the right side. Genomic organization of the pADP1 fragment delimited by *traC* and *trbN* (33 556 bp) in the newly evolved *Pseudomonas* sp. population (ADPE) resulting from 47 Kb deletion.

the *pdbL-like* sequence and *trbN* present on pADP1 on its right side from nucleotide 74 681 to nucleotide 76 623. Interestingly, this amplicon harbors a 110-bp fragment shared by the IS*Pps1* and the *pdbL-like* sequence. This suggests that this region was the site of the homologous recombination that resulted in the deletion of a 47-kb fragment in the final population. Further analysis of this 110-bp fragment with the IS Finder program (Siguier *et al.*, 2006a) showed 100% of homology to IS*Pps1* of *Pseudomonas buttiensis* (GenBank ac n° AF342828).

## 5. Discussion

Over the past three decades, repeated atrazine applications have led to the selection of microbial populations able to mineralize this herbicide and to accelerate its degradation. A number of studies have reported the isolation and the characterization of atrazine-degrading isolates (Giardi *et al.*, 1985; Behki *et al.*, 1993; Mandelbaum *et al.*, 1995; Bouquard *et al.*, 1997; Struthers *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2000; Rousseaux *et al.*, 2001; Stamper *et al.*, 2002; Strong *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004; Satsuma 2006; (Devers *et al.*, 2007a). Among the processes involved in the adaptation of the soil microflora to increasing atrazine degradation, horizontal gene transfer was shown to play a key role by favoring the exchange of the plasmid bearing the *atz* genes among the soil microflora (Devers *et al.*, 2005). Homologous recombination mediated by IS elements was also shown to contribute to the evolution of the atrazine-degrading potential by (i) shifting the *atz* gene from the plasmid to the bacterial chromosome (Devers *et al.*, 2007b) and (ii) being responsible for the duplication of *atzB* (Devers *et al.*, 2008). Under a favorable selection pressure the genetic plasticity allowed the atrazine-degrading potential to expand, leading to the development of this environment-friendly function. However, this genetic adaptation may result in a lower fitness for other environmental conditions and consequently *atz* gene losses may occur to recover an optimal fitness. In order to test this hypothesis, the mechanisms driving the evolution of the atrazine-degrading function were examined in an evolutionary experiment on *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995). The population was subjected to a constant cyanuric acid selection pressure. Cyanuric acid is the intermediary metabolite formed in the early steps of the atrazine-degrading pathway made of the *atzA*, *B* and *C* genes, and it is entirely degraded by the enzymes coded by the *atzDEF* genes. Its use as the sole source of nitrogen during our *in vitro* evolution experimentation caused the prolonged starvation of the early steps of the pathway. As a result of repeated sub-culturing of *Pseudomonas* sp. ADP on cyanuric acid medium, a newly evolved population that was more competitive in growing on cyanuric acid medium was selected. We can hypothesize that the selection pressure exerted by cyanuric acid was the driving force of this population shift.



Genetic comparison of the initial and newly evolved populations revealed that a 47 kb region of pADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes was deleted in the newly evolved population as a result of cyanuric acid selection pressure. The deletion event was further characterized by amplifying the remaining sequence surrounding the deletion on pADP1, i.e. the region formed between the *traC* and *trbN* genes. Sequence analysis revealed that the deletion event resulted from a homologous recombination that occurred between identical 110-bp sequences found in the IS*Pps1* on the *traC* side and in a *pdbL*-like sequence on the *trbN* side (Fig. D-4). The analysis of this 110-bp direct-oriented repeated sequence with an IS finder programme showed 100% homology to IS*Pps1* of *Pseudomonas buttiensis* (e value  $e^{-177}$ ). Further analysis of the *pdbL*-like sequence of pADP1 revealed that it contained at its 3' end two sequences 100% identical to IS*Pps1* of *Pseudomonas buttiensis* (970 to 1079 and 1189 to 1500 bp 100% similar to IS*Pps1* 761 to 870 and 1 to 312 bp, respectively). Careful analysis of the *pdbL*-like sequence annotated by Martinez *et al.* (2001) revealed that only the first 969 nucleotides were homologous to other *pdbL* sequences. One could therefore hypothesize that the remaining 531 nucleotides at the 3' end of the *pdbL*-like sequence containing the two truncated IS*Pps1* sequences are traces of ancient genetic rearrangements mediated by IS*Pps1*. It is noteworthy that this 110-bp region is located within a motif formed by the *pdbL*-like sequence, IS1071 and IS*Pps1* and repeated several times on pADP1. The two insertion sequences found in this motif are admittedly hotspots for recombination (Reams and Neidle, 2004). They have recently been shown to be involved in the transposition of *atzAB* genes from the pADP : Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD2 (Devers *et al.*, 2007b) and in the duplication of *atzB* genes in *Pseudomonas* sp. ADP (Devers *et al.*, 2008). Our study reveals that the deletion of the *atzABC* region is mediated by a recombination within this motif and therefore suggests that it constitutes a key element for the rapid evolution of the catabolic ability of the bacterial population under selective pressure. This hypothesis is further reinforced by the observation of a slight divergence in the number of IS*Pps1* copies (i.e. four copies instead of three) on the plasmid of *Pseudomonas* sp. ADP maintained under laboratory conditions as compared to the reference strain (Genbank U66917).

Based on these observations, we hypothesize that the deletion of the region containing the *atzA*, *B* and *C* genes in the plasmid pADP1 is responsible for the improved fitness of the newly evolved *Pseudomonas* sp. ADP population. The ability of the two populations to degrade cyanuric acid assayed on crude cell extracts, thus decoupling growth from the degradation process, further reinforces this hypothesis by showing that the initial and newly evolved populations have similar degradation abilities. In order to address the impact of genetic loss on the growth ability of *Pseudomonas* sp. ADP, the growth kinetics of the two populations was estimated on a rich

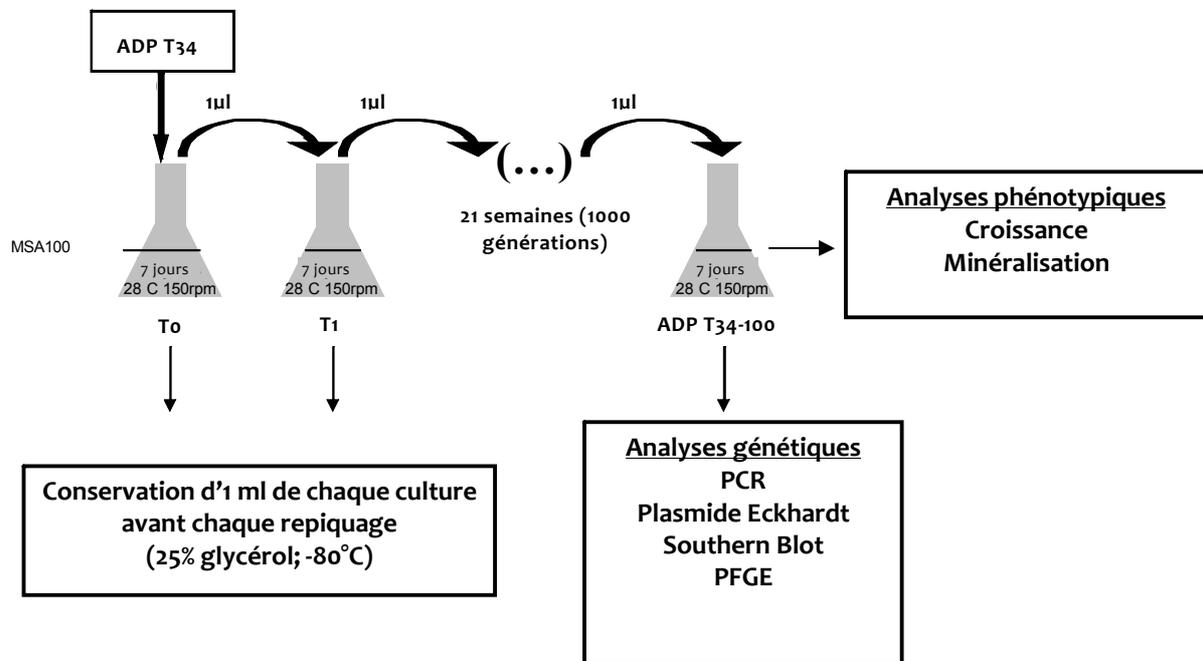


medium. The biphasic growth kinetics observed for both populations was composed of (i) a first phase during which the newly evolved population showed a higher growth rate than that of the original one and (ii) a second phase during which both populations presented similar growth characteristics. One could hypothesize that during the first phase, the selective advantage due to the loss of a 47 kb region on pADP1 led to a better growth of the newly evolved population. During the second phase, similar growth parameters could be explained by the preferential growth of sub-populations having lost the entire pADP1 plasmid, initially presents in low amount in the bacterial culture, as previously suggested by Martinez *et al.*, 2001. This observation further suggests that despite the importance of the genetic burden represented by pADP1, the genetic backgrounds of the two populations seem to be similar.

Therefore, the gain in fitness of the newly evolved population most likely does not result from an improved cyanuric acid degrading ability but from a faster growing ability due to the loss of the *atzABC* region on pADP1. Although the ISs recombination-mediated catabolic elements are well established, direct evolution studies demonstrating the selective loss of catabolic genes are scarce. Here we demonstrate that the deletion of the genetic burden constituted by the *atzABC* region and mediated by homologous recombination was selected during *in vitro* evolution of a *Pseudomonas* sp. population under cyanuric acid selection pressure. The selective loss of functional genes by different mechanisms has already been shown to be responsible for providing a net fitness gain to bacterial populations (Zinser *et al.*, 2003). Among possible explanations, such a loss may lessen the cost for pADP1 plasmid replication thereby favoring its preservation in the population. In addition, it is noteworthy that the *atzA*, *B* and *C* genes coding for the early steps of the atrazine catabolic pathway are not transcriptionally regulated but are expressed at a basal level (Martinez *et al.*, 2001), with an energy cost possibly deleterious to the original population under unfavorable selection conditions. The loss of these three *atz* genes is indeed selection-dependent, as it is a required outcome of the overall gain in fitness of the newly evolved population. As already suggested by Devers *et al.* (2008) and Udikovic-Kolic *et al.* (2011), these results highlight the tremendous genetic plasticity of the atrazine-degrading bacterial community which as a result can rapidly adapt to the variations in the selection pressure exerted by atrazine and related *s*-triazine in the environment (Devers *et al.*, 2008 ; Udiković-Kolić *et al.*, 2011). In addition, they suggest that the selection pressure exerted by the pesticide and its main metabolites drives the expansion/reduction of the genetic potential of the pesticide-degrading community. They underline the question of the pesticide-degrading function survival in complex environmental conditions where the selection pressure varies spatially and temporally. Further work will address this question.

**Tableau D-III : liste des amorces utilisées dans cette étude.**

Target sequence	Primer	Nucleotide sequence (3'>5')	Anneling temperature	Reference
atzA	A1F	ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC	60	Devers et al.,2004
	A1r	CAC CCA CCTCAC CAT AGA CC		Devers et al.,2004
atzB	B1 r	CAC CAC TGT GCT GTG GTA GA	60	Devers et al.,2004
	B1f	AGG GTG TTG AGG TGG TGA AC		Devers et al.,2004
atzC	Cf	GCTCACATGCAGGTACTCCA	57	De Souza et al .,1998
	Cr	Cr TCCCCAACTAAATCACAGC		Devers et al.,2004
atzD	Df	TCCCACCTGACATCACAAAC	60	Devers et al.,2004
	Dr	GGGTCTCGAGGTTTGATTG		Devers et al.,2004
atzE	Ef	GAGCCTCTGTCGGTAGATCG	60	Devers et al.,2004
	Er	GATGGCGTGTACCGTTTACC		Devers et al.,2004
atzF	Ff	ACCAGCCCTTGAATCATCAG	57	Devers et al.,2004
	Fr	TATTGTCCCGATACCCAACG		Devers et al.,2004



**Figure D-5 : représentation schématique du mode opératoire mis en place pour l'expérience d'évolution menée sur *Pseudomonas* sp. ADP T-34 et analyses associées.**

## Acknowledgements

The PhD of Frédérique Changey was funded by INRA (contract n° 29000180) and Burgundy Region (contract n°07 9201 PP O24 S 4209). We would like to thank Annie Buchwalter for careful editing of the manuscript. Laurent Philippot is also thanked for helpful scientific discussion about this work.

## b) Amélioration de la compétitivité de la population dégradante *Pseudomonas* sp. ADP

### Objectifs

Une manipulation d'évolution expérimentale menée sur *Pseudomonas* sp. ADP avait montré que la pression de sélection exercée par l'atrazine avait conduit à l'émergence d'une population nouvellement évoluée présentant une aptitude à dégrader l'atrazine améliorée (Devers *et al.* 2008). La caractérisation génétique de la population nouvellement évoluée a permis de montrer qu'un évènement génétique de transposition répllicative avait eu lieu. En effet une cassette génétique formée par le gène *atzB* encadré de deux éléments d'insertion du type IS1071 s'est dupliquée. Cet évènement génétique cause un « effet dosage de gène » responsable de l'amélioration de la capacité de minéralisation de l'atrazine de la population nouvellement évoluée. Cette expérimentation est une illustration de la plasticité génétique conduisant à l'amélioration des propriétés métaboliques des souches dégradant l'atrazine. Elle pose la question de l'optimum de la fonction de dégradation de l'atrazine : peut-on continuellement, améliorer les capacités de dégradation d'une population? Et si oui, quels sont les mécanismes génétiques impliqués ?

Avec cet objectif, j'ai poursuivi la manipulation d'évolution expérimentale initiée par Devers *et al.* (2008) en soumettant la population *Pseudomonas* sp. T34 à une pression de sélection atrazine élevée (milieu minéral additionné de 100 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine comme seule source d'azote)( pour mémoire le seuil de solubilité de l'atrazine est de 33 mg L<sup>-1</sup>). Cette souche possède le plasmide pADP1 contenant les gènes *atzABCDEF* codant les enzymes responsables de la minéralisation de l'atrazine, contenant une duplication en tandem du gène *atzB* sur le plasmide.

### Dispositif expérimental

Pour réaliser cette manipulation d'évolution expérimentale, la population *Pseudomonas* sp. T34 a été cultivée dans un milieu minimum MS contenant 100 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine comme seule source d'azote (seuil de solubilité 33 mg L<sup>-1</sup>). La concentration en atrazine dans le milieu de culture a été mesurée et le milieu a régulièrement été renouvelé. Après 100 cycles de culture, soit environ 1000 générations (Figure D-5), les capacités de croissance et de dégradation de l'atrazine des

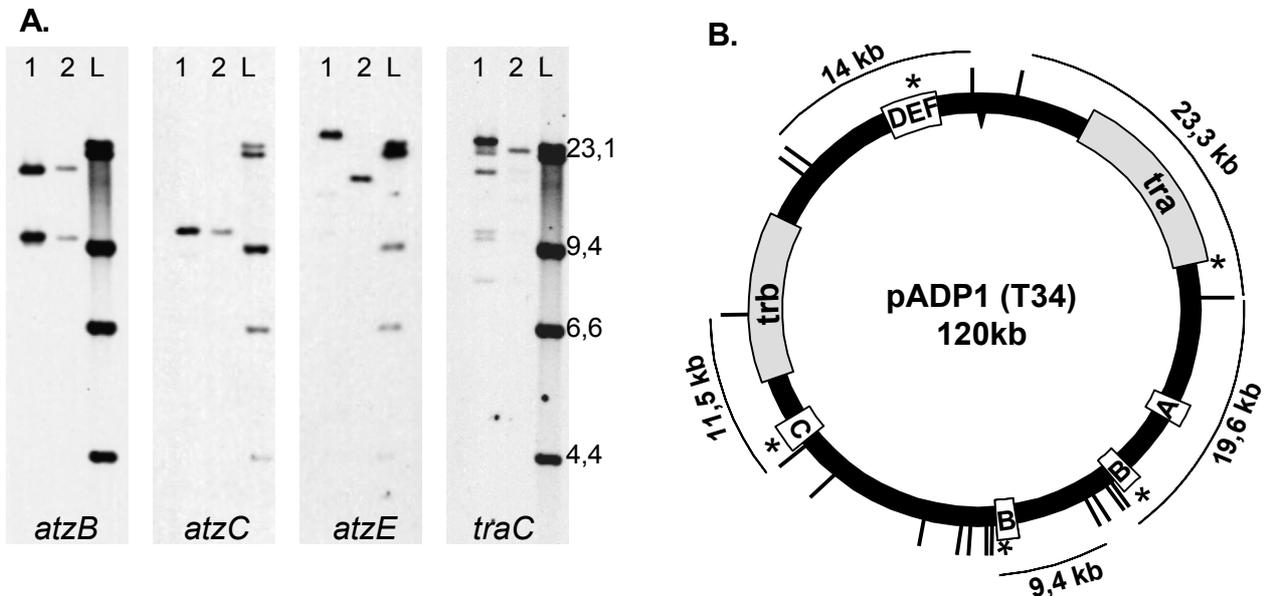


Figure D-6 : Analyse par Southern blot des souches T34 et T100. A: les profils de restriction obtenus par digestion de l'ADN des souches par *SmaI* ont été hybridés avec des sondes ciblant *atzB*, *atzC*, *atzE*, et un fragment d'ADN de 500 pb contenant la fin de l'opéron *tra* ainsi que 190 pb en aval de cet opéron. 1:ADP T34; 2: ADP T100; La taille des bandes du marqueur de poids moléculaire (L) sont indiquées en kb. B: Carte de restriction *SmaI* du plasmide ADP1 de la souche T34. Les gènes *atz* ainsi que les opérons *tra* et *trb* sont indiqués. Les séquences d'ADN ciblées par les différentes sondes sont matérialisées par des astérisques, et les tailles théoriques des fragments de restriction hybridés par ces sondes sont indiquées.

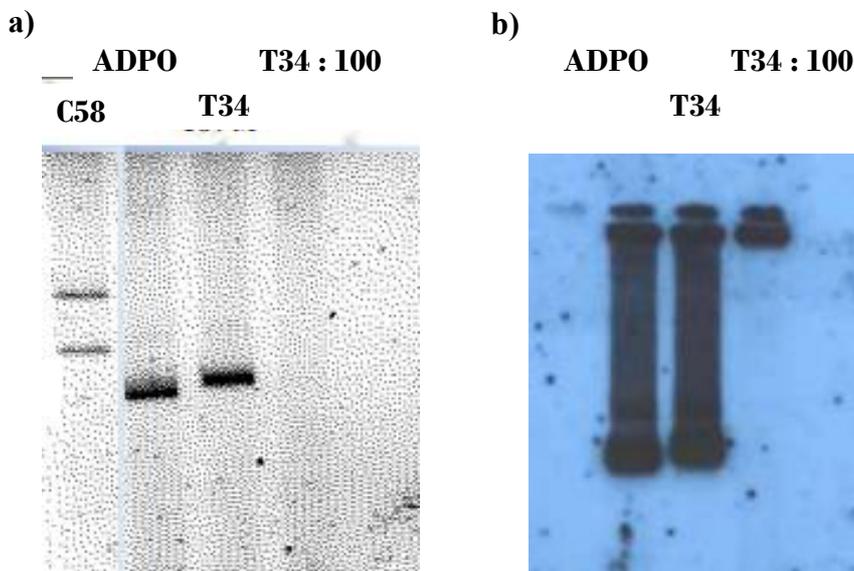


Figure D-7 :

a) Profil plasmidique des souches ADPO, T34 et T100 par plasmide Eckhardt. La piste C58 correspond à la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 servant de marqueur de poids moléculaire grâce à ses plasmides pAT (543 kb) et pTi (214 kb)

b) Profil d'hybridation du plasmide Eckhardt d'ADP, T34 et T100 hybridé en Southern blot avec la sonde *atzB*.

populations T34 et T100 ont été évaluées selon les procédures employées dans l'étude précédente (Changey *et al.*, 2011). Par ailleurs, le potentiel génétique dégradant des souches T34 et T100 a été étudié en détails en utilisant différents outils : PCR ciblant les gènes *atz* (Tableau D-III), profil plasmidique de type Eckardt, électrophorèse en champ pulsé (PFGE), Southern blot couplés à l'hybridation avec des sondes marquées à la digoxigénine. Ces méthodes sont décrites plus en détails dans la section « matériels et méthodes » du manuscrit de thèse.

## Résultats

### Analyse du potentiel génétique dégradant des populations ADP T34 et ADP T100

Le potentiel génétique dégradant de la population ADP T100 a été comparé à celui de la population ADP T34 à partir de laquelle la manipulation d'évolution expérimentale a été initiée. Les réactions de PCR ciblant les gènes *atzABCDEF* réalisées à partir de l'ADN extrait des populations ADP T34 et ADP T100 ont montré que ces deux populations présentaient le même potentiel génétique dégradant (résultats non montrés). Afin de vérifier que la population ADP T100 possédait encore la duplication en tandem du gène *atzB* observé chez ADP T34, une expérience de Southern blot a été conduite sur l'ADN d'ADP T34 et ADP T100 digéré par l'enzyme de restriction *SmaI* et hybridé avec une sonde marquée à la digoxigénine ciblant ce gène. Le profil d'hybridation révèle la présence de deux bandes caractéristiques de la duplication en tandem du gène *atzB* dans les populations ADP T100 et ADP T34 (Figure D-6).

Afin de caractériser plus en détails l'arrangement du potentiel génétique dégradant de ces deux populations, leur profil plasmidique a été réalisé selon la méthode Eckhardt utilisée en routine au laboratoire. De façon surprenante, les profils plasmidiques obtenus montrent que la population ADP T100 se caractérise par l'absence du plasmide pADP1 observé chez la population ADP T34 (Figure D-7). Des hybridations en Southern blot conduites sur ces profils plasmidiques avec une sonde ciblant le gène *atzA* montrent que si un signal d'hybridation sur pADP1 est bien obtenu pour la population ADP T34, un signal d'hybridation est observé dans le puits du gel chez ADP T100. Avec la méthode employée, les puits du gel comprennent non seulement des débris cellulaires, mais aussi le chromosome bactérien ainsi que des cellules mal lysées. Par conséquent l'observation du signal d'hybridation dans les puits du gel pour la population ADP T100 semble indiquer que le gène *atzA* porté initialement sur le plasmide pADP1 chez la souche ADP T34, aurait pu être intégré sur le chromosome bactérien de la population T100.

Pour confirmer cette hypothèse, une électrophorèse en champs pulsés précédée d'un traitement à la nucléase S1 (S1-PFGE) a été effectuée sur les populations ADP T34 et ADP T100. Cette

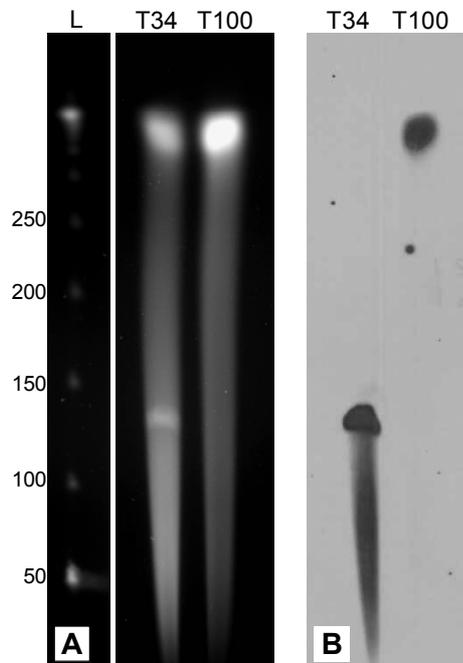


Figure D-8 : Séparation du plasmide et du chromosome des populations ADP T34 et T100 par S1-PFGE(A) et hybridation en Southern blot avec la sonde *atzB* (B) (Le marqueur de poids moléculaire utilisé (L) est un mélange de concatémères du phage lambda; la taille des plus petits concatémères est indiquée en kb).

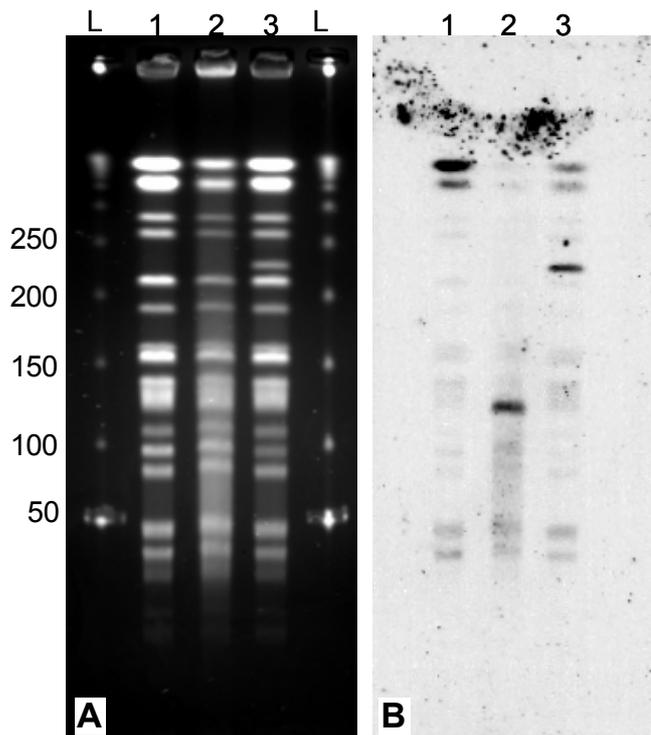


Figure D-9 : L'ADN des populations T34 et T100 a été digéré par l'enzyme *SpeI* afin de générer un profil de restriction par PFGE (A). Le profil a été hybridé avec une sonde ciblant le plasmide ADP1 dans son intégralité (B). 1: *Pseudomonas* sp. ADP curée de son plasmide. 2: *Pseudomonas* sp. ADP T34; 3: *Pseudomonas* sp. ADP T100 (Le marqueur de poids moléculaire utilisé (L) est un mélange de concatémères du phage lambda; la taille des plus petits concatémères est indiquée en kb).

méthode consiste à réaliser une lyse douce des cellules bactériennes en gel d'agarose puis à faire migrer le chromosome ainsi que le plasmide au travers d'un gel d'agarose, permettant ainsi d'obtenir un profil où le chromosome est clairement différencié des autres composants cellulaires. Les profils obtenus par cette méthode confirment l'absence de plasmide chez la population ADP T100 (Figure D8-A). De plus, leur hybridation avec une sonde ciblant le gène *atzB* (Figure D8-B) montre la présence d'un signal d'hybridation au niveau du plasmide pADP1 pour ADP T34 et au niveau du chromosome bactérien pour ADP T100. L'ensemble de ces résultats indiquent donc que chez la population ADP T100 les gènes *atzABCDEF* initialement localisés sur le plasmide pADP1 chez ADP T34 sont dans le chromosome bactérien.

Afin de déterminer si les gènes *atz* avaient été intégrés indépendamment dans le chromosome ou si cette insertion était le fait de l'insertion du plasmide dans le chromosome, des hybridations en Southern blot ont été réalisées sur le profil PFGE. Tout d'abord les ADNs des populations ADP T34 et ADP T100, ainsi que celui d'une souche de *Pseudomonas sp.* ADP curée de son plasmide (utilisée comme contrôle négatif), ont été digérés par l'enzyme de restriction *SpeI* (ne présentant pas de site de coupure sur le plasmide pADP1) (Figure D-9). Cette digestion a été hybridée avec une sonde marquée à la digoxigénine ciblant l'ensemble du plasmide pADP1. L'analyse des profils PFGE montrent l'apparition d'une bande d'environ 230 kb chez la population ADP T100. L'analyse du profil d'hybridation obtenu avec l'ADN de la souche curée révèle la présence de bandes hybridant avec la sonde pADP1 mais n'étant pas spécifique du plasmide pADP1. Chez la population ADP T34 une bande supplémentaire de 120 kb est observée : elle correspond au plasmide pADP1 entier non digéré par l'enzyme de restriction *SpeI*. Dans le cas de T100, ce fragment n'est pas visible mais une bande supplémentaire, présentant une taille d'environ 230 kb observée sur le profil PFGE, s'hybride positivement avec la sonde.

L'ensemble de ces observations semble indiquer que le plasmide pADP1 a été transféré dans un fragment de restriction *SpeI* de 230 kb situé sur le chromosome bactérien. De plus, des hybridations en Southern blot réalisées avec les sondes *atzC*, *atzB* indiquent que ces gènes sont situés sur des fragments de tailles identiques dans les populations ADP T34 et ADP T100 suggérant que l'arrangement génétique des gènes *atz* a été conservée (Figure D-6). Finalement, les hybridations obtenues avec la sonde ciblant *atzE* et *tra* montrent une modification de la taille du fragment de restriction contenant ces gènes chez ADP T100 mais aussi chez ADP T34 par rapport à la séquence de référence du plasmide pADP1 décrite par Martinez *et al.* (2001). Pour la sonde *atzE*, la taille du fragment obtenue pour ADP T34 (env. 25 kb) est différente de celle attendue (14 kb) résultant de la restriction *in silico* du plasmide pADP1 (code d'accension



GenBank U66917). Cette observation indique que le plasmide pADP1 d'ADP T34 est modifié par rapport à la souche de référence *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.* 1995; Martinez *et al.*, 2001). Il faut toutefois noter qu'au laboratoire, des hybridations antérieures conduites sur l'ADN de la souche initiale avaient déjà montré cette différence de taille (résultats non montrés). Dans le cas d'ADP T100, le fragment d'hybridation a une taille de 17,6 kb inférieure à celle observée chez ADP T34 (env. 25 kb). Cette observation indique que lors de l'intégration dans le chromosome cette région a été modifiée. En ce qui concerne les résultats obtenus avec la sonde ciblant la région contenant l'opéron *tra*, la souche T34 présente plusieurs signaux d'hybridation. Ceci est dû au fait que la sonde employée contient une séquence de 45 bp homologue à 100% aux 45 premières bases de l'*IS1071* présente en plusieurs copies chez la souche et, en conséquence, conduisant à la production de plusieurs signaux d'hybridation. Toutefois, le signal d'hybridation présentant la plus forte intensité pour ADP T34 est obtenu pour un fragment d'environ 23 kb correspondant à la taille attendue pour le fragment de restriction *SmaI* contenant l'opéron *tra*. Dans le cas d'ADP T100, le fragment présentant le plus fort signal d'hybridation mesure environ 21 kb, indiquant là encore une modification de la séquence comprise dans cette région. Ces deux derniers résultats d'hybridation suggèrent donc que l'ouverture du plasmide aurait pu avoir lieu dans la région plasmidique en aval de l'opéron *atzDEF* et en amont de la fin de l'opéron *tra*. L'ensemble des fragments de restriction *SmaI* n'ayant pas tous été comparés par hybridation entre ADP T34 et ADP T100, d'autres modifications du plasmide pADP1 lors de l'intégration dans le chromosome ne sont pas à exclure.

### **Analyse du phénotype des populations ADP T34 et ADP T100 : capacité de croissance et de dégradation de l'atrazine**

L'analyse du potentiel génétique dégradant des populations ADP T34 et ADP T100 a montré qu'un évènement d'insertion chromosomique du plasmide pADP1 avait été sélectionné au cours de l'évolution expérimentale. Afin de comprendre les raisons ayant conduit à la fixation de cet évènement génétique, le phénotype de ces deux populations a été étudié pour rechercher un éventuel gain de compétitivité de la souche T100 par rapport à la population T34.

Ainsi, l'aptitude à croître sur le milieu MSA<sub>100</sub> des populations ADP T34 et ADP T100 a été comparée. L'analyse des paramètres estimés à partir des courbes de croissance obtenues en milieu MSA<sub>100</sub> ne révèle pas de différence significative entre des populations ADP T34 et ADP T100

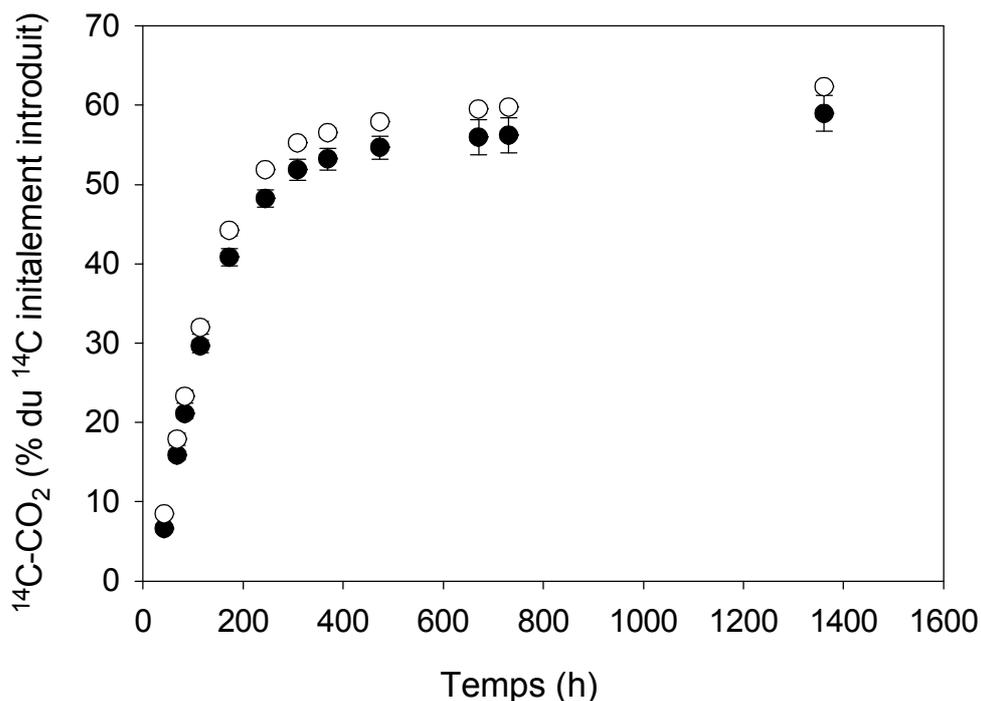


Figure D-10: Capacité de minéralisation de l'atrazine par les populations de *Pseudomonas* sp. ADP T34 et T100. Une même quantité de cellules T34 (rond noir) ou T100 (rond blanc) a été inoculée dans du tampon Knapp contenant de l'atrazine ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) et de l'atrazine marquée au  $^{14}\text{C}$  sur son cycle. La libération de  $^{14}\text{CO}_2$  suite à la minéralisation de l'atrazine a été suivie au cours de l'incubation des cellules à  $28^\circ\text{C}$  et 150 rpm. Les écarts types sont indiqués ( $n=4$ ).

Tableau D-IV : Paramètres de croissance des populations T34 et T100. Pour chaque population, une même quantité de cellules a été inoculée en milieu MSA100. La culture a été incubée à  $28^\circ\text{C}$  sous agitation, et la densité optique des cultures a été suivie au cours de la croissance. Les paramètres de croissance ( $A$ ,  $\mu\text{m}$  et temps de latence) issus des courbes de croissance obtenues sont présentés ( $n=4$ ).

	A (AU)	$\mu\text{m}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Lambda (h)
T34	0,21 +- 0,01	0,14 +- 0,01	25,1 +-0,4
T100	0,21 +-0,01	0,14 +-0,01	25,3 +-0,1

(tableau D-IV). Il est notable que ces deux populations présentent les mêmes courbes de croissance sur milieu TY riche (résultats non montrés).

La capacité à minéraliser l'atrazine des populations ADP T34 et ADP T100 a également été évaluée par radiorespirométrie. Les courbes de minéralisation obtenues pour les deux populations présentent des caractéristiques proches (Figure D-10). Toutefois, les paramètres cinétiques estimés par la modélisation des cinétiques de minéralisation avec le modèle modifié de Gompertz montrent qu'ADP T100 présente une vitesse maximale de dégradation ( $16,4 \text{ h}^{-1}$  vs  $17,5 \text{ h}^{-1}$ ) et un pourcentage maximal d'atrazine minéralisée (55,8% vs 59,2%) statistiquement supérieurs à ADP T34 ( $n=4$   $p<0,05$ ).

### Discussion et perspectives

L'expérience d'écologie évolutive conduite sur ADP T34 a montré que sous une pression de sélection élevée d'atrazine, une population nouvellement évoluée, pouvait émerger. Cette population est caractérisée par la disparition du plasmide pADP1 et son insertion sur le chromosome bactérien. Nous rapportons ici un faisceau convergent d'informations indiquant que les gènes *atzABC* et les régions nucléotidiques les encadrant sont conservés. Par ailleurs, nous avons montré que l'ensemble des gènes portés par le plasmide pADP1 (environ 110 kb) était localisé sur un seul fragment chromosomique d'environ 230 kb. Ces informations semblent indiquer que le plasmide pADP1 a été intégré entièrement dans le chromosome bactérien. Toutefois, bien que cette hypothèse soit particulièrement intéressante, nous avons obtenu des éléments qui montrent que pADP1 n'aurait pas été transféré entièrement. Ainsi, il semblerait que l'évènement d'insertion ait conduit à la perte de l'origine de réplication et/ou d'une partie de la région *tra* de pADP1. Ces observations semblent indiquer que la région plasmidique impliquée dans l'insertion chromosomique ne comporterait pas d'élément d'insertion (*ISPps1* et *IS1071*) et qu'en conséquence, cet évènement génétique ne soit pas lié à un phénomène de transposition.

Jusqu'à présent les études conduites par mon équipe d'accueil ont montré que les gènes *atz* portés principalement par des plasmides pouvaient être échangés par transfert horizontal de gène (HGT) (Devers *et al.* 2005). Il a par ailleurs été démontré que la localisation de ces gènes *atz* pouvait varier *via* des phénomènes de transposition résultant de la mobilisation des gènes *atz* par des éléments d'insertion. Ces éléments d'insertion peuvent non seulement conduire à une transposition conservative (Devers *et al.*, 2007b) mais aussi à une transposition répllicative (Devers *et al.*, 2008). La combinaison de ces phénomènes de transfert horizontal de gènes et de réarrangement génétique est probablement à l'origine de la constitution et de l'optimisation de la



voie de dégradation de l'atrazine. L'observation que nous rapportons ici pose la question de la nature du plasmide pADP1 porté par la souche *Pseudomonas* sp. ADP. Est-ce à proprement parlé un élément extra-chromosomique ? Ainsi, parmi les éléments génétiques mobiles (MGEs), constituant la fraction mobile du génome aussi dénommée « mobilome », les plasmides sont certainement les plus étudiés. On inclut aussi dans les MGEs les transposons de classe I et de classe II (Springael and Top, 2004) et depuis peu les 'îlots génomiques' ou encore appelé éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) (van der Meer and Sentchilo, 2003). Le terme générique d'ICE a été proposé pour définir des fragments d'ADN de taille importante potentiellement mobile intégrés dans le chromosome bactérien ou dans d'autres réplicons. Ils comportent dans leur séquence un gène d'intégrase et différents modules de gènes similaires au module de conjugaison plasmidique. Certains ICEs ont été montrés comme étant conjugatifs mais pour la plupart, leur mobilité d'une localisation génomique à une autre a été déduite par des analyses de génomique comparative. Bien que jusqu'à présent les gènes *atx* et *trx* aient plutôt été localisés sur des éléments extra-chromosomiques (excepté l'étude de Cai *et al.*, 2003, et celle de Devers *et al.* 2007), notre expérience suggère que pADP1 puisse constituer un ICE. Toutefois, à ce stade il n'existe que trop peu d'informations génomiques sur ces séquences pour affirmer que pADP1 constitue un ICE. Ainsi, il faudrait disposer de la séquence de plusieurs plasmides portant les gènes *atx* pour reconstituer l'histoire évolutive de la constitution de cet élément génétique mobile portant la voie métabolique. *A contrario*, le réarrangement génétique que nous avons mis en évidence suite à l'expérience d'écologie évolutive pourrait aussi constituer une illustration de la formation d'une structure 'ICE-like' à partir d'un plasmide. La discussion de ces résultats montre la frontière ténue entre la définition des différents éléments génétiques mobiles.

Si l'évènement génétique sélectionné au cours de la manipulation d'écologie évolutive au sein de la population ADP T100 a pu être partiellement caractérisé et demanderait à être approfondie notamment au travers du clonage et du séquençage du fragment de 230 kb comportant la région chromosomique où pADP1 a été inséré, l'avantage adaptatif qu'il confère n'a pas été démontré clairement. Ainsi, contrairement aux expériences précédemment réalisées (Devers *et al.*, 2008 ; Changey *et al.*, 2011), la modification du potentiel génétique dégradant ne semble pas conférer un avantage adaptatif à la population nouvellement évoluée. Les populations ADP T34 et ADP T100 présentent les mêmes aptitudes à croître sur un milieu minéral comportant l'atrazine comme seule source d'azote ou sur un milieu riche. Le seul élément semblant différencier ces deux populations concerne la capacité à minéraliser l'atrazine sensiblement plus élevée chez ADP T100 que chez ADP T34. Toutefois, cette amélioration sensible ne semble pas favoriser la croissance d'ADP T100 sur milieu MSA. On peut en revanche émettre l'hypothèse selon laquelle



ces deux populations présenteraient des capacités de survie différentes en phase stationnaire expliquant la dilution de l'une par rapport à l'autre au fil des cycles de culture. Afin de vérifier cette hypothèse, nous envisageons de conduire une expérience de compétition entre les populations ADP T34 et ADP T100. Il s'agira d'inoculer en quantité égale les deux populations en milieu MSA<sub>100</sub> et de mesurer en fin de croissance (moment du repiquage) la proportion de chaque population afin de déterminer leur fitness, ou compétitivité, par rapport aux conditions appliquées lors de l'évolution expérimentale.



**AXE 3 :**

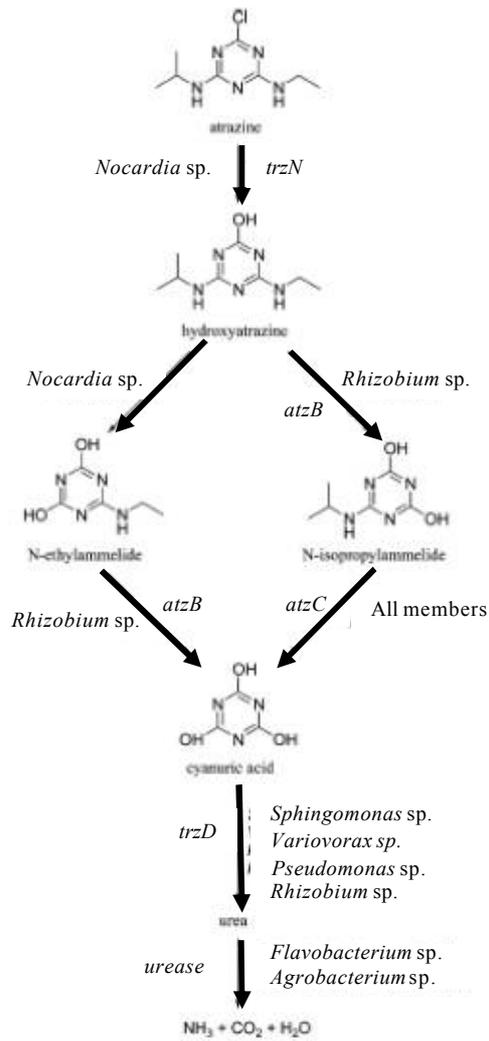


Figure E-1: coopération métabolique au sein d'un *consortium* dégradant (Smith *et al.*, 2006)

### **AXE 3 : APPROCHE COMMUNAUTAIRE : construction d'un outil pour évaluer l'évolution du potentiel génétique d'une communauté microbienne dégradant l'atrazine.**

#### **Préambule**

Les études réalisées dans les axes 1 et 2 de mon travail de thèse ont contribué à montrer que par différents processus, le potentiel génétique codant la voie catabolique de minéralisation de l'atrazine continuait d'évoluer. Ainsi, j'ai montré que des mutations dans le gène *atzA* codant la chlorohydrolase, sélectionnées dans des populations microbiennes dégradant l'atrazine, contribuaient à modifier les performances enzymatiques de la chlorohydrolase. Par ailleurs, par des expériences d'écologie évolutive, j'ai pu montrer que les populations microbiennes dégradant l'atrazine présentaient une plasticité génétique remarquable permettant d'ajuster le potentiel génétique dégradant en fonction de la pression de sélection rencontrée dans le milieu. Ainsi, en absence de pression de sélection, les gènes dégradants représentant un fardeau génétique sont éliminés (Changey *et al.*, 2011) alors qu'au contraire, la pression de sélection exercée par l'atrazine contribue à stabiliser la voie de dégradation dans le fond génétique de la souche dégradante.

Ces observations obtenues sur des souches pures cultivées en laboratoire fournissent une vision des processus évolutifs contribuant à l'évolution de la voie de dégradation de l'atrazine. Toutefois, si la véracité de ces processus évolutifs est vérifiée expérimentalement sur des souches pures, il n'en demeure pas moins que dans les sols, la voie de minéralisation de l'atrazine n'est pas réalisée par une seule population spécifique mais qu'elle est partagée au sein d'une communauté bactérienne constituée de plusieurs populations microbiennes, possédant des combinaisons génétiques différentes et coopérant pour minéraliser l'atrazine (Crowley *et al.* 2005 ; Martin-Laurent *et al.* 2006 ; Udikovic-Kolic *et al.* 2008). En effet, Crowley *et al.* (2005) ont les premiers proposé le concept de 'coopération métabolique' pour expliquer le fonctionnement d'un *consortium* microbien dégradant l'atrazine (Figure E-1). Ainsi, ils ont montré qu'au sein d'un *consortium* microbien, plusieurs populations coopéraient pour minéraliser l'atrazine. En effet, ils ont mis en évidence que la déhalogénéation et l'ouverture du cycle *s*-triazinique étaient réalisées par un type microbien tandis que les étapes intermédiaires semblaient être partagées au sein du *consortium*, et parfois même redondantes (exemple du gène *atzC* présent dans les 8 membres du *consortium*).

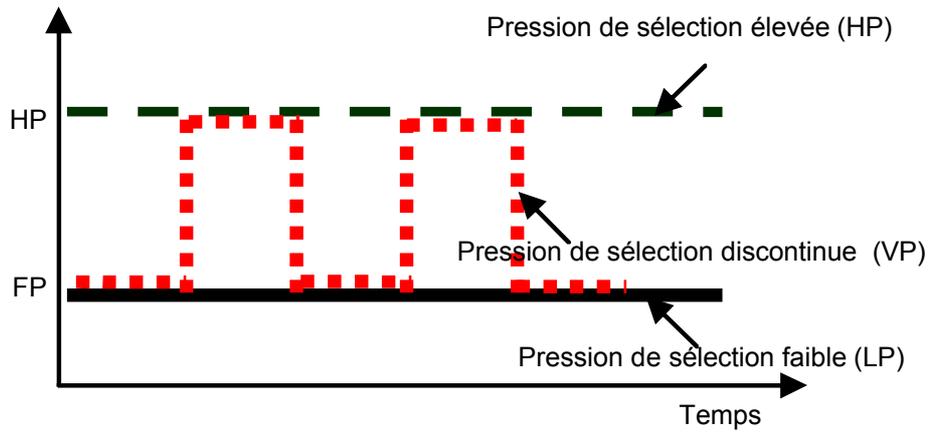


Figure E-2 : les différents types de pressions exercées : (i) pression de sélection faible (FP) représentative d'une contamination résiduelle du sol, (ii) Pression de sélection élevée (HP) représentative d'un traitement pesticide ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) appliqué de manière continue et (iii) alternance (VP) entre HP et FP représentatif de la pression discontinue exercée au champ.

De manière semblable, Udikovic-Kolic *et al.* (2008) ont rapporté l'isolement et la caractérisation d'un *consortium* microbien ayant développé la capacité à dégrader l'atrazine en réponse à une culture continue réalisée sur des échantillons provenant des eaux usées d'une usine fabriquant des *s*-triazines. Une étude menée au laboratoire (Martin-Laurent *et al.* 2006) rapportait l'isolement de *consortia* microbiens dégradant l'atrazine de la rhizosphère de maïs présentant une complexité taxonomique ainsi qu'un potentiel génétique dégradant, suggérant le partage de la voie catabolique de minéralisation de l'atrazine au sein de la communauté dégradante. Ces études confortent, par conséquent, l'hypothèse émise par Crowley *et al.* (2005).

Néanmoins ces études sont en contradiction avec le résultat des expériences d'enrichissement qui ont conduit à l'isolement de souches microbiennes possédant l'ensemble des gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de dégradation de l'atrazine. Dans ces conditions, la dernière partie de ma thèse a consisté à étudier comment, à l'échelle de la communauté, le potentiel génétique dégradant se répartit. Est-il rassemblé au sein d'une seule population ou est-il partagé au sein de la communauté dégradante ?

## **Objectifs**

Pour conduire à bien cette étude, j'ai souhaité construire une communauté bactérienne synthétique composée de différentes populations se partageant le potentiel de dégradation. Cette communauté synthétique sera alors placée dans différentes conditions environnementales (pression de sélection de l'atrazine) et son évolution sera évaluée aussi bien au niveau physiologique (activité de dégradation de l'atrazine) qu'au niveau microbiologique (composition du *consortium* dégradant) ou encore moléculaire (potentiel génétique dégradant). Pour conduire cette expérimentation, plusieurs modalités seront testées (Figure E-2) : (i) pression de sélection faible (FP) représentative d'une contamination résiduelle du sol, (ii) pression de sélection élevée (HP) représentative d'un traitement pesticide ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) appliqué de manière continue et (iii) alternance (VP) entre HP et FP représentative de la pression discontinue exercée au champ.

Faute de temps, je n'ai pu réaliser que la mise au point du dispositif expérimental consistant dans un premier temps, à choisir au sein de la banque de souches dégradantes du laboratoire des souches possédant différents potentiels dégradants. Dans ce cadre, j'ai participé à la caractérisation d'une souche dégradant l'atrazine d'un sol agricole du delta du Nil (Egypte) et qui a été utilisée dans la suite de cette étude (El Sebai *et al.* 2011). La seconde étape de ce travail a consisté à choisir des double-résistants spontanés sélectionnables à l'aide d'antibiotiques, afin d'estimer l'abondance de chacune des populations présentes dans le *consortium*. La troisième étape



a consisté à initier une expérience évolutive pour tester la faisabilité expérimentale du dispositif décrit dans la Figure E-1

Dans cette perspective, les souches dégradantes résistantes à des antibiotiques ont été mélangées et co-cultivées dans un milieu MS contenant 100 mg L<sup>-1</sup> d'atrazine comme seule source d'azote (MSA<sub>100</sub>). Le milieu a été renouvelé fréquemment et l'évolution du *consortium* a alors été suivie au cours du temps (i) en estimant la densité des différentes populations introduites par dénombrement sur des milieux de culture et (ii) en déterminant la composition en gène *atz*/*trz* de chaque population par PCR multiplexe.

## Développement méthodologique

### Isolement de la souche *Arthrobacter* sp. TES 6 d'un sol agricole du delta du Nil (Egypte)

Article El Sebai *et al.* 2011 *Int Biodet and Biodeg*, sous presse

Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta : isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain.

Talaat El Sebaï<sup>a</sup>, Marion Devers-Lamrani<sup>b</sup>, Frédérique Changey<sup>b</sup>, Nadine Rouard<sup>b</sup>, Fabrice Martin-Laurent<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Agricultural Microbiology Department, Agricultural Research Division, National Research Centre, El-Behouth street, Dokki, 12311, Cairo, Egypt.

<sup>b</sup> INRA, Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, Dijon 21065 cedex, France.

\*\*Corresponding author. Tel : 33 3 8069 3406; fax : 33 3 8069 3224. *Email address* : [fabrice.martin@dijon.inra.fr](mailto:fabrice.martin@dijon.inra.fr)

## 1. Abstract

The *s*-triazine herbicide atrazine was rapidly mineralized (i.e. about 60% of <sup>14</sup>C ring-labelled atrazine released as <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> within 21 days) by an agricultural soil from the Nile Delta (Egypt) that had been cropped with corn and periodically treated with this herbicide. Seven strains able to degrade atrazine were isolated by enrichment cultures of this soil. DNA fingerprint and phylogenetic studies based on 16S rRNA analysis showed that the seven strains were identical and belonged to the phylogeny of the genus *Arthrobacter* (99% similarity with *Arthrobacter* sp.



AD38, EU710554). One strain, designated *Arthrobacter* sp. strain TES6, degraded atrazine and mineralized of  $^{14}\text{C}$  chain-labelled atrazine. However, it was unable to mineralize  $^{14}\text{C}$  ring-labelled atrazine. Atrazine biodegradation ended in a metabolite that co-eluted with cyanuric acid in HPLC. This was consistent with its atrazine-degrading genetic potential, shown to be dependent on the *trzN*, *atzB* and *atzC* gene combination. Southern blot analysis revealed that the three genes were located on a large plasmid of about 175 kilobases and clustered on a 22 kb *SmaI* fragment. These results reveal for the first time the adaptation of a North African agricultural soil to atrazine mineralization and raise interesting questions about the pandemic dispersion of the *trzN*, *atzBC* genes among atrazine-degrading bacteria worldwide.

*Keyword* : Biodegradation; Atrazine; *Arthrobacter* sp.; *atz* and *trz* genes

## 2. Introduction

Atrazine (2-chloro-4-(ethylamine)-6-(isopropylamine)-*s*-triazine) is an *s*-triazine herbicide inhibiting photosystem II which has been used extensively world-wide to control pre- and post-emergence broadleaved and grassy weeds in major crops such as maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum spp*) and sugarcane (*Saccharum officinarum*) (Pick *et al.*, 1992; Seiler *et al.*, 1992). Until the 1980s, atrazine application rates of up to 2 kg of active ingredient per hectare per year were used for weed control (Humburg *et al.*, 1989). For the past two decades, lower doses (<1.5 kg of atrazine/ha/year in agricultural crops) have been recommended in several countries to reduce its environmental impact (Seiler *et al.*, 1992). The atrazine molecule has a relatively low solubility of approximately 30 mg l<sup>-1</sup> and a half-life in soil varying between 15 and 100 days (Protzman *et al.*, 1999). It is persistent in groundwater (Agertved *et al.*, 1992; Widmer and Spalding, 1995) and both the herbicide and its main metabolites (deethylatrazine and deisopropylatrazine) are often detected in water resources at concentrations exceeding the EU regulation limit (0.1 µg l<sup>-1</sup>). In addition, several studies revealed that atrazine had toxicological impact on non-target species, such as amphibians (Sass and Colangelo, 2006) and could act as an endocrine disruptor (Singh *et al.*, 2004). As a result, use of atrazine has recently been banned in the European Union.

Among the different processes contributing to atrazine dissipation from contaminated environments, chemical transformation occurring mainly under acidic conditions, is catalysed by soil organic matter and results in the formation of hydroxyatrazine, the hydroxylated derivative of the mother compound (Armstrong *et al.*, 1967). Microbial biodegradation has been suggested to be the most effective process for atrazine dissipation in the soil environment. For almost 30



years, atrazine was considered to be co-metabolically degraded in soil giving rise to deethylatrazine and deisopropylatrazine. At the end of the nineties, atrazine mineralization was observed in soils repeatedly treated with this herbicide (Barriuso and Houot, 1996; Ostrofsky *et al.*, 1997; Pussemier *et al.*, 1997; Yassir *et al.*, 1999; Houot *et al.*, 2000). Mineralization was shown to be positively correlated with atrazine exposure history and soil pH (Barriuso and Houot, 1996; Pussemier *et al.*, 1997; Yassir *et al.*, 1999; Houot *et al.*, 2000; Zablutowicz *et al.*, 2006), and negatively correlated with organic matter content and inorganic nitrogen fertilization (Alvey and Crowley, 1995; Gebendinger and Radosevich, 1999). These studies indicated that repeated application of atrazine to crops led to the development of a microbial community genetically able to mineralize this herbicide. Since this discovery, a number of efficient atrazine-degrading microbial strains, belonging to diverse genera, have been isolated and characterized from different soils all over the world; *Nocardia* (Giardi *et al.*, 1985), *Rhodococcus* (Behki *et al.*, 1993), *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995), *Rhizobium* (Bouquard *et al.*, 1997), *Alcaligenes* (De Souza *et al.*, 1998), *Agrobacterium* (Struthers *et al.*, 1998), *Pseudaminobacter* (Topp *et al.*, 2000b), *Chelatobacter*, *Aminobacter*, *Stenotrophomonas* (Rousseaux *et al.*, 2001), *Ralstonia* (Stamper *et al.*, 2002), *Arthrobacter* (Strong *et al.*, 2002), *Acinetobacter* (Singh *et al.*, 2004), *Nocardioides* (Satsuma, 2006), *Sinorhizobium* and *Polaromonas* (Devers *et al.*, 2007b). Up to now, *Pseudomonas* sp. ADP has been the most widely studied strain from which the atrazine-degrading pathway, *atzABCDEFGHI* genes and catabolic enzymes have been characterized (Mandelbaum *et al.*, 1995). The first three enzymes (ATZ A, B and C) are responsible for the transformation of atrazine to cyanuric acid whereas ATZ D, E and F catalyze the three-step mineralization of cyanuric acid. Further research revealed other genes responsible for atrazine transformation i.e. the gene *trzN*, equivalent to *atzA* and the gene *trzD* equivalent to *atzD* (Mulbry, 1994; Karns, 1999). Up to now, all known atrazine-degrading isolates have been shown to harbor different *atz* and/or *trz* gene combinations (Devers *et al.*, 2007a). Most Gram-negative bacteria able to mineralize <sup>14</sup>C-ring labelled atrazine carry the *atzA* or *trzN/atzBC* and *atzDEF* or *trzD* genes. On the contrary most Gram-positive strains able to transform atrazine to cyanuric acid, carry only the *trzN* and *atzBC* genes. This intermediary metabolite can readily be used by many soil bacteria as a nitrogen source (Cook and Hutter, 1984; Cook, 1987).

This study was carried out to check for enhanced atrazine biodegradation in an agricultural field regularly exposed to this s-triazine herbicide in the Nile Delta (Egypt). Enrichment cultures were conducted to isolate and characterize bacterial populations from this soil. These bacterial isolates were then taxonomically characterized by cloning and sequencing the 16S rRNA gene. Atrazine-degrading genetic potential was determined by PCR and Southern blot hybridization. The ability



of one isolate to transform atrazine was characterized by HPLC and radiorespirometric analyses using  $^{14}\text{C}$ -ethyl-chain or ring-labelled atrazine.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Chemicals

Atrazine (96% technical grade) was kindly supplied by the Pesticide Laboratory Centre, Agricultural Research Centre, Ministry of Agriculture, Egypt.  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled atrazine (Isotopchim, specific activity 910 MBq mmol<sup>-1</sup>; 98% radiochemical purity) and  $^{14}\text{C}$ -chain-labelled atrazine (Isotopchim, specific activity 1776 MBq mmol<sup>-1</sup>; 98% radiochemical purity) were used. An atrazine stock solution (100-ppm) was prepared in methanol and stored at 4°C.

#### 3.2. Medium

Atrazine mineral salt (AMS) medium [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1.6 g l<sup>-1</sup>),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4 g l<sup>-1</sup>), NaCl (0.1 g l<sup>-1</sup>),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 g l<sup>-1</sup>),  $\text{CaCl}_2$  (0.02 g l<sup>-1</sup>),  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5 mg l<sup>-1</sup>), borate (2 mg l<sup>-1</sup>),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1.8 mg l<sup>-1</sup>),  $\text{ZnSO}_4$  (0.2mg l<sup>-1</sup>),  $\text{CuSO}_4$  (0.1mg l<sup>-1</sup>), NaMo (0.25mg l<sup>-1</sup>), biotin (0.1 mg l<sup>-1</sup>), thiamine (0.04 mg l<sup>-1</sup>)], containing atrazine as sole nitrogen source and citrate as carbon source (1 g l<sup>-1</sup>) (Devers *et al.*, 2005) was used to perform enrichment and to culture the atrazine-degrading isolates. Atrazine at 30 ppm was used as sole nitrogen source in liquid medium. AMS solid medium prepared with 15 g of agar per liter was obtained by adding a 2 mL methanolic solution to obtain a final concentration of 500 mg l<sup>-1</sup>, which formed a chalky suspension.

#### 3.3. Soil samples

Soil samples were collected in April 2006 from the top 15 cm layer of an agricultural field located at Al-Gharbia Governorate (GPS coordinates 3047.28 N et 30.59.53 E, Nile Delta, Egypt) and cropped with courgettes. This agricultural field had occasionally been cropped with corn and consequently, had been treated with atrazine. The soil is a fertile clay presenting the following physicochemical properties : EC 2.59 dSm<sup>-1</sup>, pH 7.72, Ca 7.5, Mg 5.0, K 0.9, Na 14.5,  $\text{HCO}_3$  0.75,  $\text{SO}_4$  20.9, Cl 6.25 (in meq.l<sup>-1</sup>). Soil samples were sieved (5.0 mm mesh) to remove stones and plant debris, then stored at 4°C in plastic bags until use. The moisture content and water holding capacity of each soil sample were determined before beginning the experiment.



### 3.4. Atrazine mineralization potential of soil

The ability of indigenous soil microorganisms to mineralize atrazine was determined by radiorespirometry (Soulas, 1993). Briefly, soil samples (10 g equivalent dry weight) moistened to 80% of the water holding capacity were treated with 3.60 MBq of  $^{14}\text{C}$ -ring uniformly labelled atrazine [910 MBq  $\text{mmol}^{-1}$ , 98% radiochemical purity (Sigma)] with added atrazine to give a final atrazine concentration of 1.5 mg  $\text{kg}^{-1}$  soil. Three replicates were prepared. Radiorespirometers were incubated in the dark at 28°C for 80 days.  $^{14}\text{CO}_2$  released from the  $^{14}\text{C}$ -atrazine was trapped in 5 mL of 0.2 M NaOH solution and regularly analysed by liquid scintillation counting using ACS II scintillation fluid (Amersham). A second atrazine treatment was applied after 78 days of incubation under the above-described conditions.

### 3.5. Isolation of atrazine-degrading strains

Atrazine-degrading strains were isolated from enrichment cultures on an atrazine indicator plate as described previously (Mandelbaum *et al.*, 1995). Briefly, 5 g of soil (dry weight equivalent) were added to 45 mL of AMS-medium in 250 mL flasks and incubated in the dark at  $30\pm 2^\circ\text{C}$  on an orbital shaker at 150 rpm. Atrazine degradation rates were estimated by measuring the concentration of atrazine remaining in the enrichment culture, using HPLC. Aliquots (0.5 mL) were periodically sampled, centrifuged to remove soil and cell debris and then analysed by HPLC. When up to 90% of the initially-added atrazine had been degraded, 5 mL of the soil suspension were transferred to fresh AMS-medium and incubated under similar conditions as described above. After two successive enrichment cultures, 100  $\mu\text{l}$  aliquotes of fresh enrichment culture dilutions ( $10^{-2}$  to  $10^{-4}$ ) were plated on solid AMS-medium. The plates were incubated at room temperature in the dark and were observed daily. Colonies forming a clear zone were identified as possible atrazine-degrading isolates. They were selected and further purified by repeated streaking on solid AMS medium. Isolated strains were preserved in 50% glycerol and kept frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for further analyses.

### 3.6. Cloning and sequencing of 16S rDNA sequence

Bacterial DNA was extracted from the TES6 isolate using the non-organic DNA extraction kit according to the manufacturer's instructions. The 16S rDNA genes were amplified from 50 ng of DNA in a 50  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 1.25 U of Taq polymerase (Oncor-Appligene, France), and 0.5  $\mu\text{M}$  of 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', positions 8-27 of

**Tab. E-I : sequence of the primer pairs used in this study.**

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)	Reference
atzA	A1f	ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC	60	De Souza et al., 1998
	A1r	CAC CCA CCT CAC CAT AGA CC		
atzB	B1f	AGG GTG TTG AGG TGG TGA AC	60	De Souza et al., 1998
	B1r	CAC CAC TGT GCT GTG GTA GA		
atzC	Cf	GCT CAC ATG CAG GTA CTC CA	57	De Souza et al., 1998
	C1r	TCC CCC AAC TAA ATC ACA GC		
atzD	Df	GGG TCT CGA GGA TTT GAT TG	60	Devers et al., 2004
	Dr	TCC CAC CTG ACA TCA CAA AC		
atzE	Ef	GAG CCT CTG TCC GTA GAT CG	60	Devers et al., 2004
	Er	GAT GGC GTG TAC CGT TTA CC		
atzF	Ff	ACC AGC CCT TGA ATC ATC AG	60	Devers et al., 2004
	Fr	ACT TAC AAA CGC ACC GAA CC		
trzN	C190-10	CAC CAG CAC CTG TAC GAA GG	57	Mulbry et al., 2002
	C190-11	GAT TCG AAC CAT TCC AAA CG		
trzD	TrzDf1	CCT CGC GTT CAA GGT CTA CT	60	Rousseaux et al., 2001
	TrzDr1	TCG AAG CGA TAA CTG CAT TG		

*Escherichia. coli* 16S rDNA) and 1492r (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3', positions 1492-1513 of *E. coli* 16S rDNA) primers (Gurtler and Stanisich, 1996). DNA amplification was carried out in a PTC 200 gradient cyler (MJ Research, Waltham, MA, USA) using the following condition : 5 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 2 min at 72°C, plus an additional 15 min cycle at 72°C.

16S rRNA amplicons were cloned into the pGemT-EasyII plasmid according to the manufacturer's recommendations (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced by Beckman Coulter Genomics (USA). The 16S rRNA sequence was deposited in the GenBank database under the accession number HQ665017. This sequence was compared with sequences deposited in the Genbank database using BlastN. Sequences were aligned with ClustalX software. A neighbour-joining tree was constructed with the NJ Plot programme.

### 3.7. PCR assays of atrazine-degrading genes

The composition of the atrazine-degrading genes in the isolated strains was determined by PCR using the primers listed in Table E-I, as previously described (Devers *et al.*, 2008). Briefly, 50 ng of bacterial DNA were used as template for PCR reactions carried out in a 50 µl reaction volume. The amplification conditions were as follow : 5 min at 95°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at optimal annealing temperature (Table E-I), 1 min at 72°C, plus an additional 7 min cycle at 72°C.

### 3.8. Determination of the atrazine-degrading capacity of *Arthrobacter* sp. TES6

The ability of the isolated strain to degrade atrazine was determined. The strain was grown in AMS, harvested in late exponential phase, washed twice in Knapp buffer and resuspended to an optical density (620 nm) of 0.5 (i.e.  $0.5 \times 10^6$  cfu.mL<sup>-1</sup>) in this buffer containing 50 mg L<sup>-1</sup> atrazine (n=3). Cell suspensions were incubated at 28°C under agitation (125 rpm). Aliquotes of the medium were taken at regular intervals throughout the incubation period. Bacterial suspensions were centrifuged at 3000 g for 10 min. Supernatants were analysed by HPLC to monitor atrazine dissipation using a LC Star system (Varian) equipped with a Microsorb-MV C18 column (length 25 cm, internal diameter 4.6 mm, Varian). The isocratic HPLC mobile phase contained methanol/ultra-pure water (75/25, v/v). The flow rate was adjusted to 1 mL min<sup>-1</sup> and chromatography was conducted at 30°C. Atrazine was detected using a UV detector set at 220 nm.

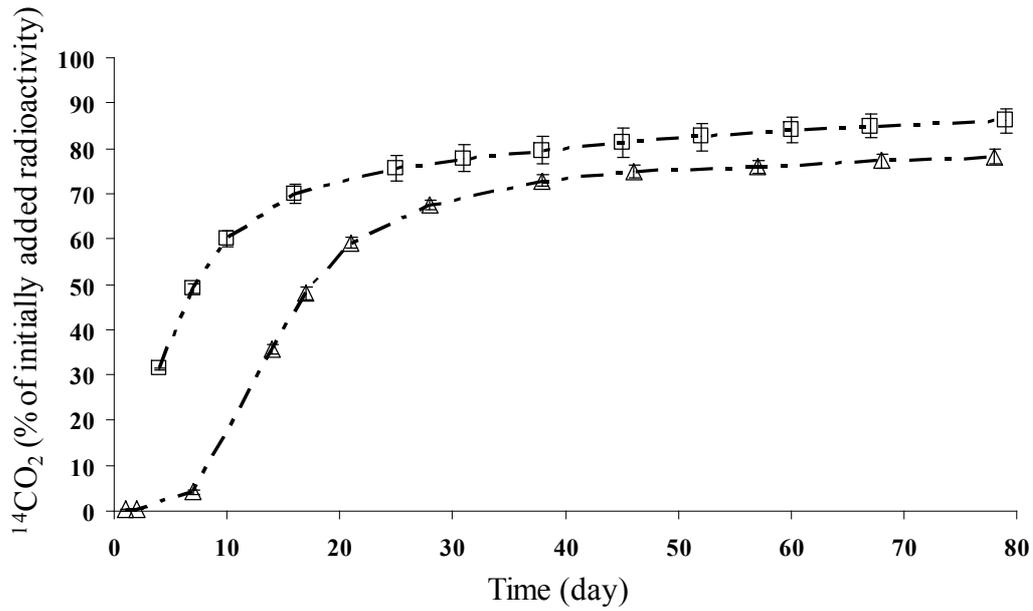


Figure E-3 : kinetics of mineralization of  $^{14}\text{C}$  ring-labelled atrazine measured in soil samples collected from an agricultural field located in Al-Gharbia Governorate (Nile Delta, Egypt) and treated either once ( $\Delta$ ) or twice ( $\square$ ) with atrazine. Error bars indicate standard error (n=3).

The atrazine mineralization kinetics of the isolated bacterial population were measured by radiorespirometry using  $^{14}\text{C}$ -ethyl-chain or ring-labelled atrazine in Knapp buffer. Following the above-described procedure, fresh cultures of the isolated strain were used to prepare a bacterial cell suspension with an optical density of 0.5 in Knapp buffer containing  $50\text{ mg l}^{-1}$  of atrazine and  $1.7\text{ Kbc}$  of  $^{14}\text{C}$ -labelled atrazine ( $n=3$ , for each labelling). Bacterial cell suspensions were incubated for one week at  $28^\circ\text{C}$  on an orbital shaker ( $125\text{ rpm}$ ) in closed sterile respirometers ( $250\text{ mL}$ ) containing  $0.5\text{ M NaOH}$  traps. The traps were regularly collected and analysed by liquid scintillation counting described above.

### 3.9. Plasmid profiles

Cells of *Arthrobacter* sp. TES6 were grown in liquid AMS-medium as described above. One mL of fresh culture ( $0.2\text{ OD}$  at  $620\text{ nm}$ ) was harvested and centrifuged ( $15\ 000g$  for  $3\text{ min}$ ). The bacterial pellet was collected to obtain plasmid profiles using the method of Eckhardt (Eckhardt, 1978) as modified by Wheatcroft (Wheatcroft *et al.*, 1990). Plasmid sizes were determined by calibrating against the relative mobilities of the plasmids used as standard : (i) pAT ( $543\text{ kb}$ , accession number AE007872) and pTi ( $214\text{ kb}$ , accession number AE007871) harboured by *Agrobacterium tumefaciens* C58, and (ii) a mega-plasmid ( $1500\text{ kb}$ ), pRme41 : Tn7 ( $236\text{ kb}$ ) and pRP4 ( $60\text{ kb}$ , accession number L27758), harboured by a derivative of *Rhizobium meliloti* 41 (GMI328).

### 3.10. Modelling of atrazine mineralization kinetics

The kinetics of atrazine mineralization were fitted to a modified Gompertz model (Zwietering *et al.*, 1990) using Sigma plot 4.0. The model equation was :  $y = A \cdot \exp\{-\exp[1 + \mu m \cdot \exp(1) \cdot (\lambda - t)/A]\}$  where  $y$  is the percentage of mineralization (%),  $t$  is the time (h),  $\mu m$  is the maximum mineralization rate ( $\% \text{ h}^{-1}$ ),  $A$  is the maximum percentage of mineralization (%) and  $\lambda$  is the lag time (h). The parameters were validated by a Student's t-test ( $P < 0.005$ ).

## 4. Results

### 4.1. Atrazine mineralization potential of the agricultural soil

The study was performed on soil collected from an agricultural field in the Nile Delta (Egypt) cropped with courgettes and discontinuously exposed to atrazine. Radiorespirometric determinations of the ability of the soil microflora to mineralize atrazine showed that all the soil samples were able to mineralize this herbicide (Fig. E-3). Approximately 60% of the  $^{14}\text{C}$ -ring-

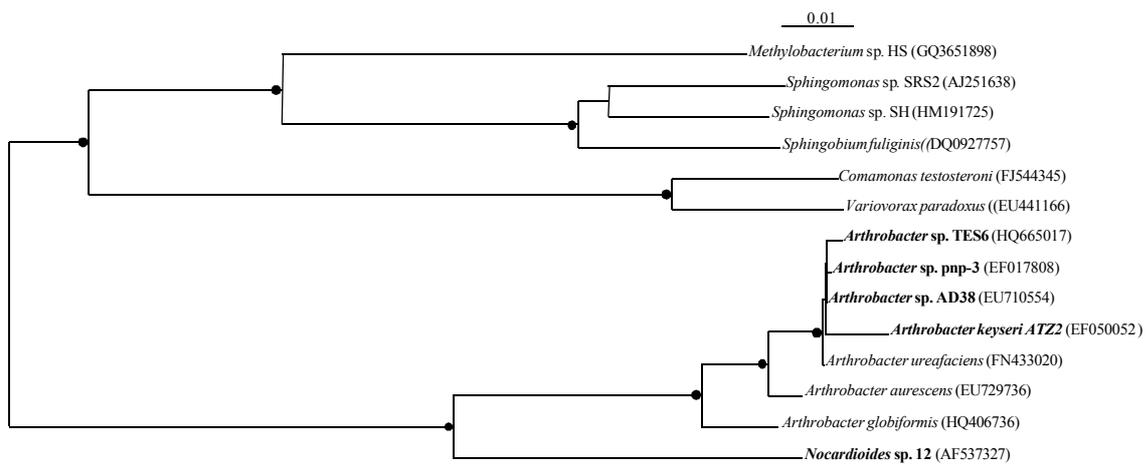


Figure E-4 : neighbour-joining phylogenetic analysis resulting from multiple alignment of the 16S rRNA gene of *Arthrobacter* sp. TES6 and related sequences found in the GenBank database. Atrazine-degrading isolates are in bold. Genbank accession numbers are given in brackets. Bootstrap values higher than 900 % are marked as black circles. The phylogenetic distance is shown on a scale bar.

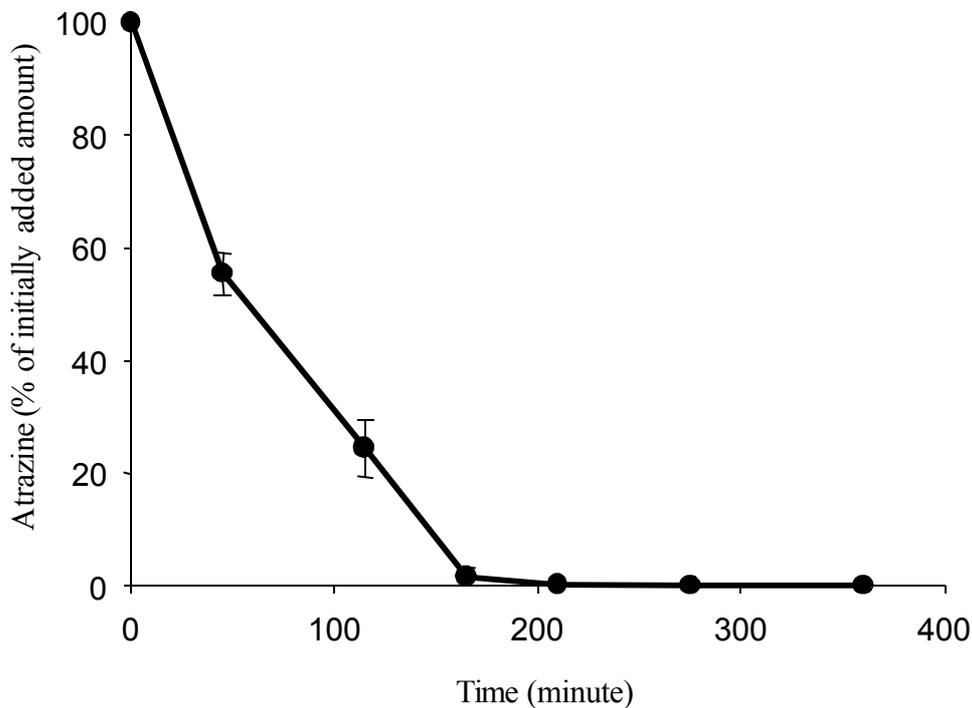


Figure E-5 : kinetics of atrazine degradation by *Arthrobacter* sp. TES6 inoculated in Knapp buffer containing 50 mg L<sup>-1</sup> atrazine and incubated in the dark at 28°C under 150 rpm agitation. Error bars indicate standard error (n = 3).

labelled atrazine initially added was converted to  $^{14}\text{CO}_2$  over three weeks (Fig. E-3). The ability of the soil microflora to mineralize atrazine was even improved by the second atrazine treatment for which a similar level of mineralization was reached within only two weeks. The maximum mineralization rate ( $\mu\text{m}$ ), estimated by fitting the modified Gompertz model to the atrazine mineralization kinetics of the soil samples, was significantly higher after the second treatment ( $\mu\text{m}_2$  7.83%  $^{14}\text{CO}_2\cdot\text{day}^{-1}$ ) as compared to that of the first treatment ( $\mu\text{m}_1$  4.51%  $^{14}\text{CO}_2\cdot\text{day}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). The two other kinetic parameters, i.e. maximum atrazine mineralization rate ( $A_1$  78.23 and  $A_2$  86.1%  $^{14}\text{CO}_2$ ) and lag phase ( $\lambda_1$  8 and  $\lambda_2$  2 days), were similarly affected by the repetition of the atrazine treatment. As a result of periodical exposure to atrazine, the soil microflora of this agricultural field had adapted to mineralize atrazine. In addition, the activity of the atrazine-degrading community was promoted in response to herbicide exposure which therefore suggests the presence of specific microbial populations able to degrade this herbicide.

#### 4.2. Isolation of an atrazine-degrading bacterial strain

Enrichment cultures were used to isolate the atrazine-mineralizing strain from the Al-Gharbia field populations. HPLC analysis of the liquid medium revealed that the bacterial culture was able to degrade atrazine after two successive enrichments (data not shown). The bacterial culture was then serially diluted and inoculated on AMS plates. After two weeks of incubation, twelve colonies forming a clear zone due to atrazine degradation were selected. The atrazine-degrading colonies on the AMS plates were clear, buff-coloured, smooth and circular. The purity of these colonies was verified by streaking them several times on AMS plates. The atrazine-degrading activity of the pure isolates was verified by HPLC. In total, seven of the twelve isolates showed atrazine-degrading activity.

These seven isolates gave an identical ARDRA fingerprint (data not shown). One of them (designated TES6) was chosen for further analysis. The 16S rRNA amplicon (1,447 bp) of this isolate was sequenced and deposited in the GenBank database under the accession number HQ665017. Blast analysis revealed that the 16S rRNA sequence of TES6 shared the highest degree of similarity (99%) with the 16S rRNA sequence of *Arthrobacter* sp. AD38 (Genbank accession number EU710554). Based on its phylogenetic relationship with several *Arthrobacter* spp. (Fig E-4), this atrazine-degrading bacterial isolate was named *Arthrobacter* sp. TES6.

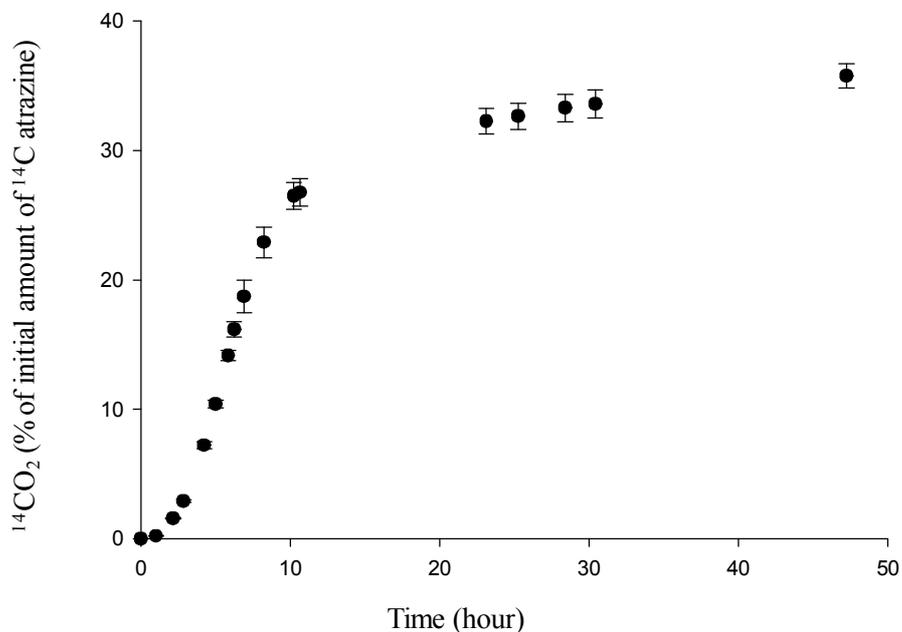


Figure E-6 : kinetics of <sup>14</sup>C-chain-labelled atrazine mineralization by *Arthrobacter* sp. TES6 incubated in the dark at 28°C under 150 rpm agitation. Error bars indicate standard errors (n = 3).

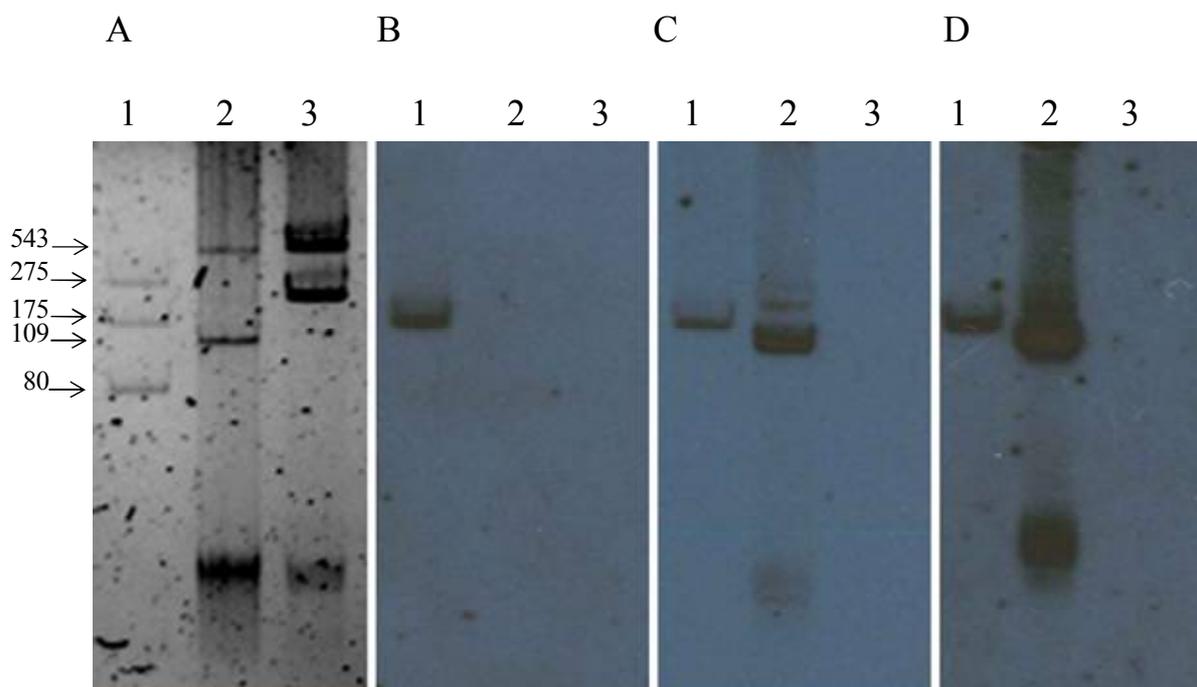


Figure E-7 :

Panel A. Plasmid profiles of *Arthrobacter* sp. TES6 (Lane 1, plasmid size: 80, 175 and 275 kb), *Agrobacterium tumefaciens* C58 pADP1::Tn5 (Lane 2, plasmid size 109 and 543 kb), and *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Lane 3, plasmid size 214 and 543 kb).

Panels B, C and D; Southern blot hybridization carried out on plasmid profiles of *Arthrobacter* sp. TES6 (Lane 1) *Agrobacterium tumefaciens* C58 pADP1::Tn5 (Lane 2), and *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Lane 3) with *trzN*, *atzB* and *atzC* digoxigenin probes, respectively.

#### 4.3. Characterization of the atrazine-degrading ability of *Arthrobacter* sp. TES6 and its atrazine-degrading genetic potential

The degrading ability of *Arthrobacter* sp. TES6 was tested by HPLC. The degradation kinetics showed that *Arthrobacter* sp. TES6 completely degraded 30 ppm of atrazine within 3 hours of incubation (Fig. E-5). The accumulation of a metabolite co-eluting with cyanuric acid (data not shown) suggested that this strain was not able to entirely mineralize atrazine. Radiorespirometric experiments reinforced this hypothesis since *Arthrobacter* TES6 was unable to mineralize <sup>14</sup>C ring-labelled atrazine during one week of incubation.

However, it was able to mineralize up to 30% of the initially added <sup>14</sup>C-chain-labelled atrazine in less than 24 hours of incubation (Fig. E-6). These observations indicate that *Arthrobacter* sp. TES6 could only transform atrazine to cyanuric acid, a known intermediary metabolite of atrazine.

PCR amplification of *Arthrobacter* sp. TES6 DNA with various *atz* and *trz* primers yielded amplicons of the expected sizes for *trzN*, *atzB* and *atzC*. No amplicons were detected for *atzADEF* and *trzD* genes (data not shown). The plasmid profile revealed the presence of three plasmids approximately 80, 175 and 275 kb in length. Southern blot analysis of the plasmid profiles of *Arthrobacter* sp. TES6 showed that only the 175 kb plasmid gave a hybridization signal with *trzN*, *atzB*, and *atzC* digoxigenin probes (Fig. E-7B, C and D). In addition, Southern blot analysis performed on *Arthrobacter* sp. TES6 genomic DNA digested with *Sma*I restriction enzyme further indicated that the *trzN* and *atzBC* genes were located on the same 22 kb DNA fragment (data not shown). We therefore concluded that the atrazine-degrading potential of *Arthrobacter* sp. TES6 consisted of the *trzN*, *atzB*, and *atzC* genes. The gene products presumably dechlorinate then dealkylate atrazine, which would be consistent with the observed accumulation of cyanuric acid.

## 5. Discussion

We report for the first time the enhanced degradation of atrazine in an Egyptian agricultural soil from the Nile Delta that had been discontinuously treated with this herbicide. The microflora of this soil, from the Al-Gharbia Governorate field, was able to mineralize about 60% of the initially added <sup>14</sup>C-ring-labeled atrazine to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> after only 21 days of incubation. This observation accords with earlier reports of enhanced atrazine degradation in agricultural soils regularly treated with this herbicide (Barriuso and Houot, 1996; Pussemier *et al.*, 1997; Yassir *et al.*, 1999; Houot *et al.*, 2000). It is also consistent with previous reports of high atrazine mineralization ability in



agricultural soils treated every two years with this herbicide (Zablotowicz *et al.*, 2007). However, it contradicts an earlier study conducted in Ohio which demonstrated that atrazine mineralization decreased over a 3 year crop rotation following a single application of the herbicide, as compared to a continuous corn cropping system in which atrazine was applied once per year (Ostrofsky *et al.*, 1997). We observed a marked increase in mineralization rate, following the second application of atrazine. As already suggested (Piutti *et al.*, 2002), it can be hypothesized that the atrazine-degrading community grew in response to the first treatment, and was ready to mineralize the atrazine applied in the second treatment. It could be concluded that the soil microflora in the Al-Gharbia Governorate field was adapted to atrazine mineralization. This in turn indicated the presence of microbial populations genetically able to mineralize atrazine.

Enrichment cultures yielded in the isolation of seven isolates forming clear zones on AMS medium. They showed similar phenotypes and identical 16S rDNA fingerprints, which suggests that they were identical. It is most likely that the successive enrichment procedure led to the dominance of this atrazine-degrading bacterial population. Phylogenetic analysis, based on 16S rRNA, revealed that this isolate showed up to 99% identity with *Arthrobacter* sp. AD38 (Genbank accession number EU710554), an atrazine-degrading strain from a contaminated soil mixture. After *Arthrobacter* sp. GZK-1 isolated from Kenya, TES6 is the second atrazine-degrading strain of *Arthrobacter* to be isolated from an African agricultural field regularly treated with atrazine (Getenga *et al.*, 2009). It is noteworthy that TES6 clustered with several other atrazine-degrading *Arthrobacter* strains isolated from geographically distant soils (including France, Croatia, USA, and China). This is consistent with previous reports of the isolation of Gram-positive atrazine-degrading bacterial isolates belonging mainly to the *Arthrobacter* genus, e.g., *Arthrobacter crystallopoites* (Rousseaux *et al.*, 2001), *Arthrobacter aurescens* TC1 (Strong *et al.*, 2002), *Arthrobacter* sp., AD1 (Cai *et al.*, 2003), *Arthrobacter nicotinovorans* HIM (Aislabie *et al.*, 2005), *Arthrobacter* sp. AG1 (Dai *et al.*, 2007), *Arthrobacter* sp. 3A and 2B (Devers *et al.*, 2007a), *Arthrobacter* sp. MCM B-436 (Vaishampayan *et al.*, 2007) and *Arthrobacter* sp., AD26 (Li *et al.*, 2008).

*Arthrobacter* sp. TES6 was able to completely remove 30 ppm of atrazine after only 3 hours of incubation. It mineralized about 30% of the added amount of <sup>14</sup>C chain-labelled atrazine but was not able to mineralize <sup>14</sup>C ring-labelled atrazine. This accords with the observed accumulation of a metabolite co-eluting with cyanuric acid and suggests that TES6 only possessed those genes coding for enzymes responsible for transforming atrazine to cyanuric acid. This hypothesis was further confirmed by its degrading genetic potential, which was found to consist of *trzN*, *atzB* and *atzC* genes encoding the enzymes responsible for converting atrazine to cyanuric acid.



Interestingly, the majority of atrazine-degrading *Arthrobacter* strains characterized to date harbour the *trzN*, *atzB*, *C* gene combination and are able to convert atrazine to cyanuric acid. Only two isolates, *Arthrobacter* sp. MCM B436 harbouring the *trzN*, *atzBCD* gene combination (Vaishampayan *et al.*, 2007) and *Arthrobacter* sp. GZK-1, for which the atrazine-degrading genetic potential remains unknown, have exhibited the capacity to completely mineralize atrazine. Therefore, the gene combination (*trzN*, *atzBC*) presented by *Arthrobacter* sp. TES6 is similar to that found in the majority of Gram-positive atrazine-degrading bacterial isolates. This atrazine-degrading gene composition was first reported in *Nocardioides* sp. SP12 (Piutti *et al.*, 2003) and then in *Arthrobacter aurescens* TC1 (Sajjaphan *et al.*, 2004). Devers *et al.* (2007) detected this gene combination in several other strains belonging to the *Nocardioides* and *Arthrobacter* genera and demonstrated for the first time the presence of this gene combination in Gram-negative bacteria such as *Sinorhizobium* sp. and *Polaromonas* sp. More recently, Arbeli and Fuentes (Arbeli and Fuentes, 2010) showed in a biogeographic study conducted in Columbia that the gene *trzN* was prevalent over its *atzA* analogue and could not only be found in numerous atrazine-degrading isolates belonging to the *Arthrobacter* and *Nocardioides* genera but also in the Gram-negative *Ancylobacter* genus. This reinforces the hypothesis of possible gene exchange between different genera in the order Proteobacteria, which has been further strengthened by recent demonstration of the high potential horizontal gene transfer of *trzN* by soil lysogenic viruses (Ghosh *et al.*, 2008). Interestingly, in *Arthrobacter* sp. TES6 the *trzN*, *atzBC* genes are clustered on a 22 kb *SmaI* fragment located on a large plasmid (about 175 kb) as previously observed for *Arthrobacter aurescens* TC1 (160 kb located on pAA1 of about 380 kb) and *Nocardioides* sp. 12 (14.9 kb located on a plasmid of about 200 kb) (Sajjaphan *et al.*, 2004; Devers *et al.*, 2007a). This observation raises questions about the ways in which *atz* and *trz* genes flow within atrazine-degrading microbial communities. As recently suggested by Arbeli and Fuentes (2010), it seems that geographic barriers are not very effective for isolating *atz* and *trz* genes since these latter can be found in different strains isolated from distinct soils on different continents. This is leading to interesting questions concerning the evolution and transport of *atz* and *trz* genes between atrazine-degrading communities.

In conclusion, this is the first report of isolation of a soil-borne microbial strain from an agricultural soil in Egypt, *Arthrobacter* sp. TES6, adapted to atrazine mineralization and able to efficiently degrade this herbicide. This bacterial isolate harbours the *trzN*, *atzBC* gene combination responsible for converting atrazine to cyanuric acid. This report is the first to identify the presence of this atrazine-degrading gene combination on the African continent and confirms the world wide dispersion of this *trzN*, *atzBC* gene combination.



## Acknowledgements

We would like to thank Dr. Nabil Emera (Pests and Plant Protection Department, National Research Centre) for providing the soil used in this study, and also Dr. Alaa Marzok (Laboratory Centre of Pesticides, Institute of Agricultural Research) for generously supplying the atrazine active ingredient used in this study. We would like to acknowledge Diana Warwick for carefully editing our manuscript.

## Fabrication d'un *consortium* "modèle" dégradant

### 1. Description des souches dégradantes choisies dans le souchier.

Parmi le souchier du laboratoire, 4 souches bactériennes divergentes taxonomiquement et présentant des potentiels génétiques dégradants différents ont été utilisées : *Pseudomonas* sp. ADPE, *Chelatobacter* sp. SR38, *Arthrobacter* sp. TES (El Sebaï *et al.*, 2011) et *Variovorax* sp. 38R (Tableau E-II).

(i) *Pseudomonas* sp. ADPE dérive de *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.* 1995), une souche bactérienne minéralisant l'atrazine grâce aux enzymes codées par les gènes *atzABCDEF* localisés sur le plasmide pADP1 qui a été entièrement séquencé (U66917, Martinez *et al.* 2001). *Pseudomonas* sp. ADPE a été obtenue au cours de mon travail de thèse par une expérience d'évolution expérimentale réalisée en milieu MS contenant de l'acide cyanurique comme seule source d'azote (Changey *et al.*, 2011). Cette souche possède l'opéron *atzDEF* sur le plasmide pADP1 duquel un fragment de 47 kb, contenant les gènes *atzA*, *B* et *C*, a été délété (axe 2 de la thèse). Cette souche a perdu sa capacité à minéraliser l'atrazine mais a gardé la capacité à ouvrir le cycle *s*-triazinique de l'acide cyanurique (voie basse de la minéralisation de l'atrazine) et, en conséquence, à se développer sur milieu MS contenant de l'acide cyanurique comme seule source d'azote.

(ii) *Chelatobacter* sp. SR38 (LR3-3), isolée d'un sol agricole par Rousseaux *et al.* (2001), possède la combinaison génétique dégradante *atzABC* et *trzD*. De ce fait, cette souche microbienne assure l'ensemble de la voie de minéralisation de l'atrazine. Le potentiel génétique de dégradation de cette souche est réparti sur différentes localisations génomiques : les gènes *atzC* et *trzD* sont localisés sur un plasmide de 178 kb tandis que les gènes *atzA* et *atzB* sont localisés sur des plasmides de 74 kb et 138 kb, respectivement (Rousseaux *et al.*, 2002).

(iii) *Arthrobacter* sp. TES06 a été isolée d'un sol égyptien comme le montre la partie ci-dessus (El Sebaï *et al.*, 2011). Cette souche assure la voie haute de la minéralisation de l'atrazine, la



transformant en acide cyanurique. Elle possède les gènes *trzN*, *atzB* et *atzC* localisés sur un fragment génomique de 22 kb situé sur un plasmide d'environ 175 kb.

(iv) *Variovorax* sp. MD2 (38R) dérive d'un transconjugant isolé de la rhizosphère du maïs (Devers *et al.* 2005) ayant acquis par transfert horizontal le plasmide pADP1::Tn5 du donneur *Agrobacterium tumefaciens* St96-4. Chez cette souche (38R), les gènes *atzA* et *atzB*, localisés dans un transposon composite sur pADP1, ont été transférés sur le chromosome bactérien (Devers *et al.*, 2007b). Des cultures répétées menées sur un milieu riche (TY) ont permis d'isoler une souche bactérienne ayant perdu les gènes *atzCDEF*. Cette souche est capable de se développer sur milieu MS supplémenté d'atrazine comme seule source d'azote, transformant alors l'atrazine en N-isopropylammélide.

## 2. Sélection de souches résistantes aux antibiotiques

Afin de rendre les souches dégradantes sélectionnables chacune par des antibiotiques, pour les différencier les unes par rapport aux autres et permettre leur dénombrement au sein de la communauté dégradante, elles ont été rendues résistantes à différents couples d'antibiotiques (Tableau E-II). Cette option a été retenue au détriment d'une approche moléculaire par PCR quantitative ciblant l'ARNr 16S bactérien des différentes souches parce que cette dernière ne permet pas d'étudier les réarrangements génétiques au sein des différentes populations constituant la communauté dégradante. Les antibiotiques choisis pour cette étude sont la rifampicine (Rf : 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), la kanamycine (Km : 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), la streptomycine (St : 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et la spectinomycine (Sp : 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Pour induire les résistances, chaque souche a été cultivée sur milieu liquide contenant le substrat *s*-triazinique adéquat (atrazine ou acide cyanurique) permettant sa croissance. Une fois la culture bactérienne développée, une aliquote de 0,1 à 1 mL de la culture bactérienne a été étalée sur milieu riche (TY) contenant l'antibiotique correspondant à la résistance recherchée et incubé à 28°C. Au bout de quelques jours, les colonies s'étant développées sur le milieu contenant l'antibiotique ont été cultivées sur un milieu minéral contenant l'acide cyanurique ou l'atrazine (28°C, 150 rpm) afin de s'assurer qu'elles avaient conservé leur capacité dégradante. A l'issue de la croissance sur le milieu minéral, les cultures bactériennes ont alors été diluées successivement au  $1/10^{\text{ème}}$  et les dilutions  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  ont été étalées à nouveau sur milieu TY avec antibiotiques afin de vérifier leur résistance. Une fois la résistance à l'antibiotique avérée, les cellules ont été testées par PCR pour vérifier leur potentiel génétique dégradant (*atz* et *trz*) qui peut évoluer au cours de ces différentes étapes de culture.

**Tableau E-II : souches employées dans cette étude. Les gènes de dégradation *atz/trz* présents chez chaque souche ainsi que les antibiotiques auxquels elles résistent sont indiqués.**

Souches	Gènes de dégradation	Double résistance aux antibiotiques
ADPE	<i>atz<sub>DEF</sub></i>	St/Rf
SR38	<i>atz<sub>ABC</sub> trz<sub>D</sub></i>	Km/St
TES	<i>atz<sub>BC</sub> trz<sub>N</sub></i>	Sp/Rf
38R	<i>atz<sub>AB</sub></i>	Sp/Km

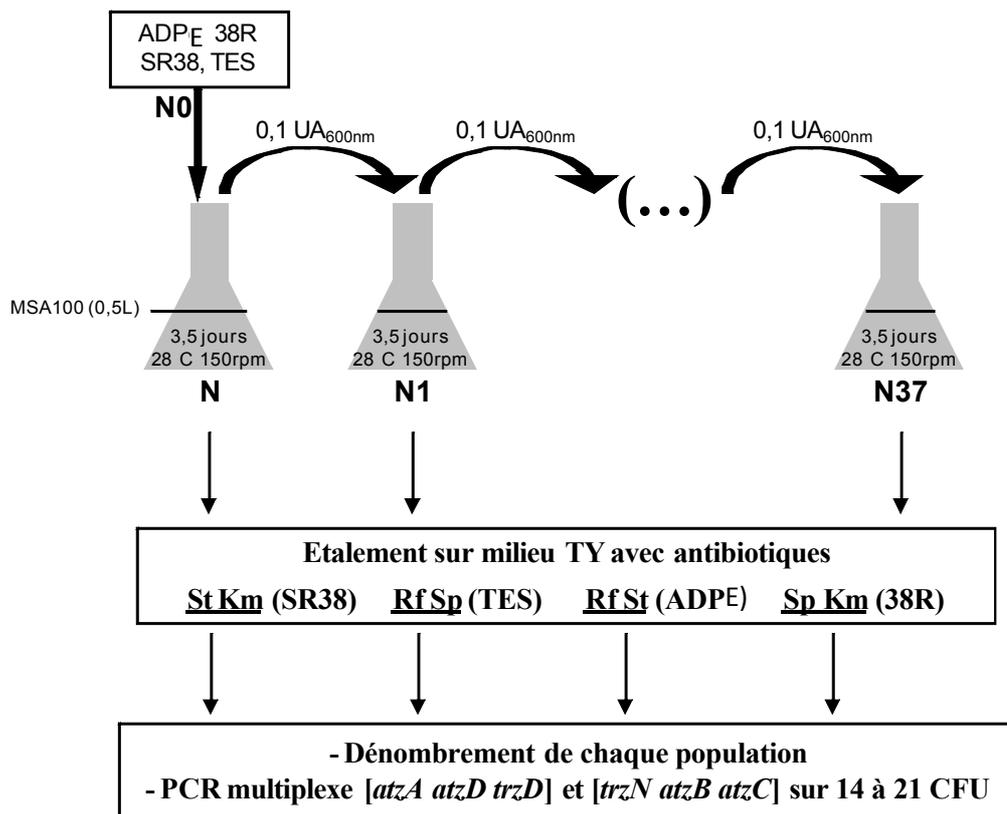


Figure E-8 : protocole de la manipulation d'évolution expérimentale conduite sur le *consortium* dégradant synthétique constitué de *Pseudomonas sp.* ADPE, *Arthrobacter TES*, *C. heintzii* SR38 et *Variovorax sp.* 38R et des analyses effectuées pour chacun des membres du *consortium*.

Pour acquérir des souches bactériennes présentant une double résistance à des antibiotiques, la même approche a été réalisée sur les souches résistantes selon le mode opératoire décrit ci-dessus avec l'antibiotique adéquat. Les souches ainsi obtenues (Tableau E-II) ont été conservées (i) à court terme sur milieu MS contenant de l'atrazine ou de l'acide cyanurique et (ii) à long terme à -80°C dans du glycérol (30%).

### 3. Mise en place de l'expérience de l'évolution expérimentale

#### 3.1 Mode de culture du *consortium*

Le *consortium* synthétique est constitué de quatre souches dégradant l'atrazine ou l'acide cyanurique. Pour constituer le *consortium*, chaque souche a été cultivée séparément en milieu MSAC<sub>150</sub> (ADPE) ou MSA<sub>100</sub> (SR38, 38R et TES). Au début de l'expérience (N0), 0,3 unité DO (absorbance à 600 nm) de chacune des souches a été inoculée dans 500 mL de milieu MSA<sub>100</sub>, puis incubée à 28°C sous agitation (150 rpm). Tous les 4 jours, la densité optique de la culture était mesurée et 0,1 unité DO était inoculée dans du milieu MSA<sub>100</sub> et incubée dans les conditions décrites figure E-8. A l'occasion de ces différents repiquages, des aliquotes étaient prélevées et stockées à -20°C jusqu'à leur analyse. A l'heure actuelle, 38 repiquages ont été réalisés (culture N0 à N37).

#### 3.2 Suivi de la densité populationnelle du *consortium*

Comme expliqué ci-dessus, nous avons choisi de suivre l'abondance de chaque population au sein du *consortium* par dénombrement sur des milieux de culture additionnés d'antibiotiques. La densité de chaque population dans le *consortium* a été mesurée au début de l'expérimentation (N0) puis à la fin de chaque cycle de culture : N2, N4, N6, N8, N9, N10, N14, N17, N22, N27, N31 et N37. Pour ce faire, les aliquotes de milieu de culture ont été successivement diluées au 1/10<sup>ème</sup> et des dilutions adéquates ont été étalées sur des milieux TY contenant différents couples d'antibiotiques permettant de sélectionner chacune des souches. Après une incubation de 2 à 4 jours, les colonies ont été dénombrées (CFU) sur chacun des milieux afin d'estimer la densité de chaque population dans le *consortium*.

#### 3.3 Suivi de la composition du potentiel génétique dégradant de chaque population

Afin de déterminer la composition du potentiel génétique de chaque souche composant le *consortium* dégradant, 14 à 21 colonies s'étant développées sur les milieux TY avec antibiotiques



ont été choisies de manière aléatoire et remises en suspensions dans 200 µL d'eau stérile. 100 µL de ces suspensions ont été mélangés avec 500 µL de glycérol 50% et congelés à -80°C. Le reste des suspensions a servi à réaliser des PCR ciblant les gènes *atz* et *trz*.

Pour la recherche des gènes *atz/trz* par PCR, deux PCR multiplexes ont été réalisées. La première, ciblant les gènes *trzN*, *atzB* et *atzC*, a été conduite avec les couples d'amorces C190-10/C190-11, B1R-B1F, C1R-CF, respectivement. La seconde ciblant les gènes *atzA*, *atzD* et *trzD*, a été menée avec les couples d'amorces AR-AF, DR-DF et *trzDR-trzDF* respectivement. Notons que les gènes *atzD*, *E* et *F* étant organisés en opéron, nous avons choisi de détecter le gène *atzD* seulement, en faisant l'hypothèse que sa détection valait aussi pour les gènes *atzE* et *atzF*.

Les réactions de PCR multiplexe ont été menées dans un volume final de 25 µl contenant 2,5 µl de matrice ADN, 10 µM de chaque amorce, 0,2 µM de dNTP et 1 U de Taq polymérase (MPBio, France). La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (PTC 200 Gradient, MJ Research, Waltham, USA). Elle a consisté en une étape de 1 min à 94°C, suivie de 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 57°C et 1,5 min à 72°C, et d'une étape finale de 7 min à 72°C.

A l'issue de la PCR, les amplifiats obtenus ont été séparés par électrophorèse (à 100 V pendant 20 minutes) dans un gel d'agarose (2,5%). Le gel d'électrophorèse a été coloré dans un bain de bromure d'éthidium, placé sur une table à ultra-violets (UV) et photographié à l'aide d'une caméra CCD.

## 4. Résultats

### 4.1 Mise en place de l'expérience évolutive

Dans ce travail exploratoire, consistant à développer un outil d'écologie expérimentale permettant d'étudier la dynamique de la communauté microbienne dégradant l'atrazine en fonction de la pression de sélection environnementale, une communauté synthétique a été construite à partir de *Pseudomonas* sp. ADPE, *Chelatobacter* sp. SR38, *Arthrobacter* sp. TES et *Variovorax* sp. 38R. Ces 4 souches bactériennes divergentes taxonomiquement présentent des potentiels de dégradation de l'atrazine différents (Tableau E-II). *Variovorax* sp. 38R et *Arthrobacter* sp. TES sont capables de transformer l'atrazine selon la voie haute aboutissant respectivement à la formation d'N-isopropylammelide et d'acide cyanurique. *Pseudomonas* sp. ADPE est capable de transformer l'acide cyanurique selon la voie basse de la minéralisation de l'atrazine. Enfin, *Chelatobacter* sp. SR38 est capable de minéraliser entièrement l'atrazine, étant doté des gènes codant les enzymes de la voie haute et de la voie basse de la minéralisation de l'atrazine. Ces quatre souches ont été

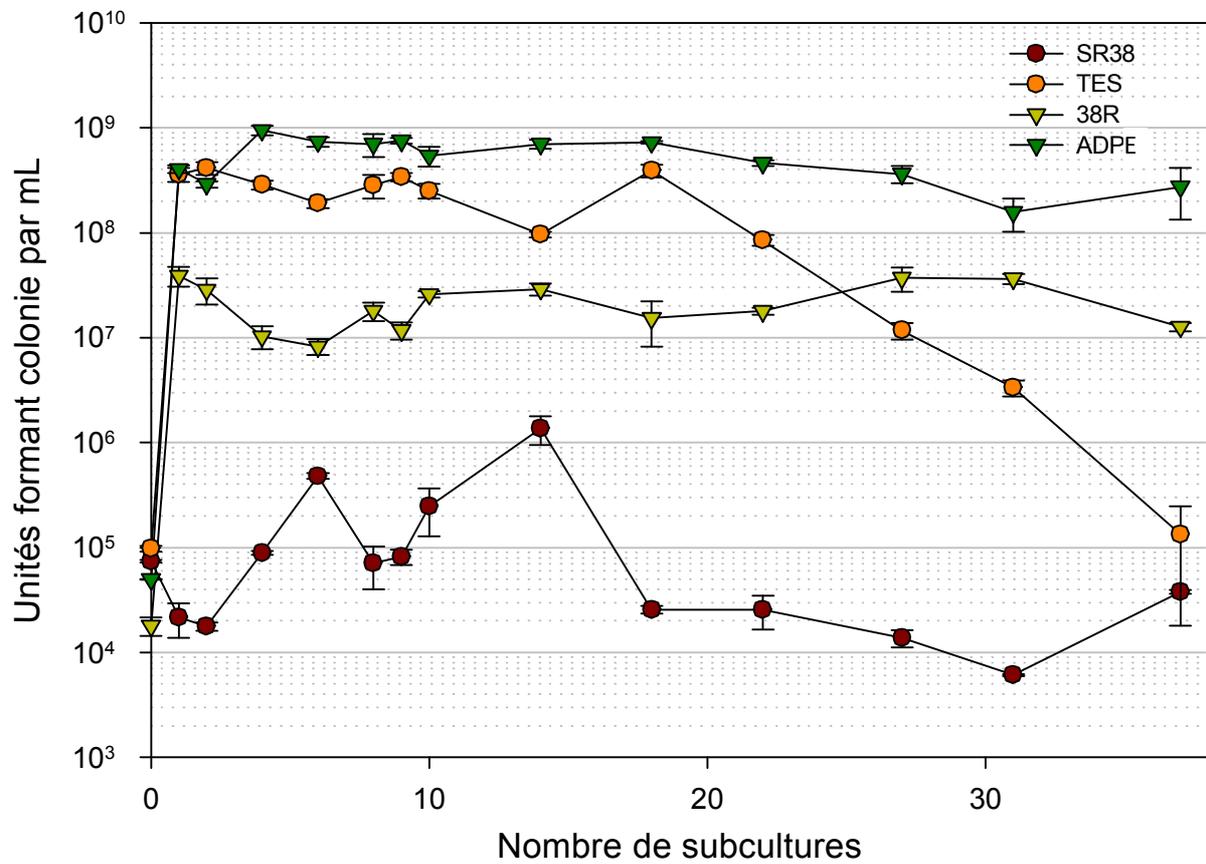


Figure E-9 : abondance des 4 populations au sein du *consortium* au cours des cycles de culture (N0, N, N2, N4, N6, N8, N9 N10, N14, N18, N22, N27, N31, N37). Les populations ont été dénombrées sur milieu TY contenant les couples d'antibiotiques sélectifs de chaque population bactérienne.

co-inoculées (ratio 1 : 1 : 1: 1) en milieu MSA<sub>100</sub> (N0), puis cultivées à 28°C sous agitation à 120 rpm. Tous les 4 jours, le milieu était renouvelé suite à une dilution au 1/2500<sup>ème</sup> de la culture dans du milieu MSA<sub>100</sub>. Ces cultures ont été répétées pendant 38 cycles (N à N37) et sont toujours en cours d'évolution. Nous avons estimé que, selon ce mode opératoire, l'expérimentation a conduit à environ 420 générations (11 générations par cycle sur 38 cycles), en faisant l'approximation que chacune des populations constituant le *consortium* se développait à la même vitesse.

#### 4.2 Evolution de la composition spécifique du *consortium*

L'évolution de la densité de chaque population constituant le *consortium* dégradant a été mesurée selon le mode opératoire décrit ci-dessus. Les résultats des dénombrements présentés ci-dessus montrent que l'abondance de chaque population évolue différemment au cours de l'expérience (Figure E-9). En ce qui concerne la population de *Pseudomonas* sp. ADPE (*atzDEF*), initialement inoculée à 5.10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, nous observons que sa densité atteint dès le premier cycle de culture 4.10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Au cours de l'évolution expérimentale, sa densité reste stable variant de 1,5.10<sup>8</sup> à 9,5.10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, du moins au stade de la culture auquel le repiquage est effectué. Notons qu'à partir du 4<sup>ème</sup> cycle, la population de *Pseudomonas* sp. ADPE représente la population majoritaire au sein du *consortium* dégradant.

*Arthrobacter* sp. TES (*trzN*, *atzBC*), inoculée à 1.10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, atteint dès la première culture une densité de 3,6.10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Cette densité reste relativement stable pendant les 22 premiers cycles de culture. Toutefois, à partir du 27<sup>ème</sup> cycle, sa densité n'a cessé de décroître au sein du *consortium*. Au dernier dénombrement (N37), la population d'*Arthrobacter* sp. TES présentait une abondance de 1,3.10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, proche de la densité à laquelle elle avait été inoculée.

Concernant la population de *Variovorax* sp. 38R (*atzAB*), inoculée à 1,8.10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, la densité de sa population semble rester stable au cours des cycles de culture, variant entre 8,2.10<sup>6</sup> et 3,9.10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

Finalement, la population *Chelatobacter* sp. SR38 (*atzABC trzD*) inoculée à 7,4.10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup> présente des densités variables au cours des différents cycles de culture, variant de 6,7.10<sup>3</sup> à 1,4.10<sup>6</sup> par mL. Il semblerait toutefois que, depuis le 18<sup>ème</sup> cycle de culture, la densité de cette population au sein du *consortium* se soit stabilisée (de 6,1.10<sup>3</sup> à 3,8.10<sup>4</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) à un niveau inférieur auquel elle avait été introduite au début de l'expérience évolutive.

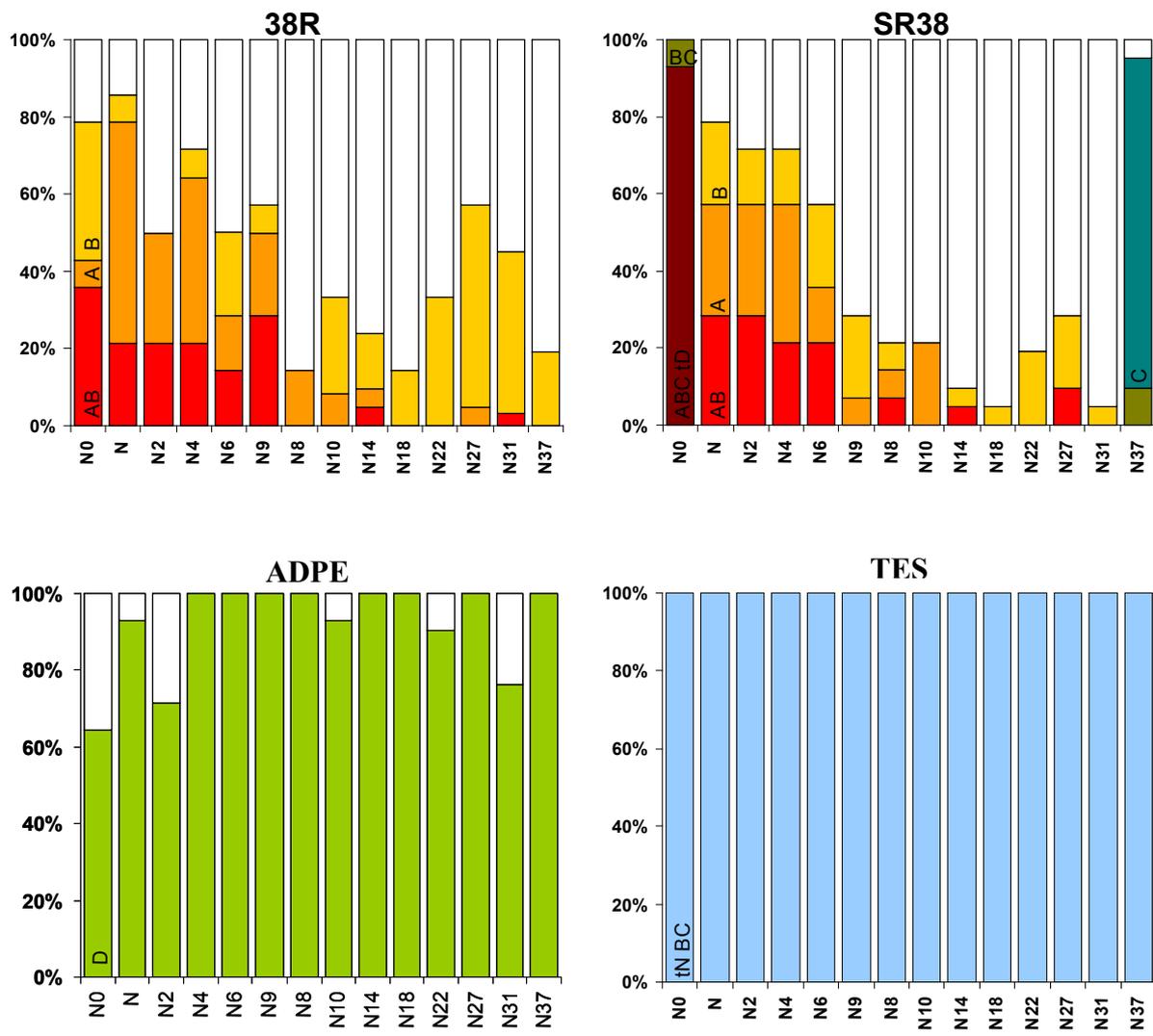


Figure E-10 : composition du potentiel génétique dégradant des différentes populations au cours de l'évolution expérimentale. Les gènes dégradants *atzA*, *B*, *C*, *D*, *trzN* et *trzD* ont été recherchés par PCR sur des colonies issues de chaque population choisies de manière aléatoire (n=14 ou 21). Pour chaque population, le pourcentage de chaque composition génétique observée est indiqué. Chaque couleur correspond à une composition génétique indiquée au sein des histogrammes (A : *atzA* ; B : *atzB* ; C : *atzC* ; D : *atzD* ; tN : *trzN* ; tD : *trzD*).

### 4.3 Evolution du potentiel génétique dégradant de chaque population constituant le *consortium* dégradant

L'évolution du potentiel génétique dégradant de chaque population constituant le *consortium* dégradant a été suivie par une approche PCR multiplexe conduite sur des colonies représentatives de chaque population sélectionnée sur les milieux sélectifs ayant permis leurs dénombrements (n=14 ou 21) (Figure E-10). Pour la population de *Pseudomonas* sp. ADPE présentant l'opéron *atzDEF* sur le plasmide pADP1 modifié (Changey *et al.* 2011), toutes les colonies testées au cours de l'expérimentation possèdent le gène *atzD*. Les gènes *atzDEF* étant organisés en opéron, la détection du gène *atzD* signifie que la population ADPE a conservé l'opéron *atzDEF* tout au long de l'expérience évolutive. Par ailleurs, aucun autre signal PCR n'a pu être obtenu pour les autres gènes ciblés, indiquant l'absence d'acquisition d'autres gènes de dégradation et, notamment, ceux codant des enzymes impliquées dans la voie haute de minéralisation de l'atrazine.

Pour la population d'*Arthrobacter* sp. TES présentant les gènes *trzN* et *atzBC* (El Sebai *et al.* 2011), la plupart des colonies testées au cours de l'expérimentation présentaient un signal PCR avec les amorces ciblant les gènes *trzN* et *atzBC*. Il faut toutefois noter qu'une faible proportion des PCR réalisées sur les colonies de TES s'est révélée négative pour les gènes *trzN* et *atzBC*, indiquant qu'une partie de la population aurait perdu ces gènes. Par ailleurs, aucun autre signal PCR n'a pu être obtenu pour les autres gènes ciblés, indiquant l'absence d'acquisition d'autres gènes de dégradation et, notamment, ceux codant des enzymes impliqués dans la voie basse de minéralisation de l'atrazine.

Pour la population de *Variovorax* sp. 38R présentant théoriquement une cassette *atzAB* délimitée par des séquences d'insertion localisées sur le chromosome bactérien, les PCR réalisées au début de l'expérience (N0) indiquent que la population inoculée était un mélange de sous-populations possédant soit le gène *atzA* soit les gènes *atzAB* soit le gène *atzB* ou aucun gène. Au cours de l'expérience évolutive, la proportion de chacune de ces sous-populations n'a cessé de varier. Toutefois, dans les derniers cycles de culture, les sous-populations sans gène de dégradation ou avec seulement *atzB* semblaient devenir majoritaires. *A contrario*, le gène *atzA* initialement présent semble disparaître au sein de la population de *Variovorax* sp. 38R.

Concernant la population de *Chelatobacter* sp. SR38, présentant les gènes *atzABC* et *trzD*, les PCR réalisées au début de l'expérience montre que 93% de la population possédait ce potentiel génétique dégradant. Toutefois, 7% des colonies ne présentaient que les gènes *atzBC*. De façon intéressante, dès le premier cycle et jusqu'au 31<sup>ème</sup> cycle de culture, les gènes *atzC* et *trzD* n'ont



plus été détectés dans cette population. Cela signifie soit que les gènes ont été perdus soit qu'ils sont toujours présents, mais au sein d'une sous-population faiblement représentée au sein du *consortium* (inférieure à 7%, 1 sur les 14 colonies étudiées). De plus, au cours de l'expérience évolutive, différentes combinaisons génétiques ont été observées : aucun gène,  $atzAB$ ,  $atzA$  ou  $atzB$ . Ceci indique que plusieurs sous-populations de SR38 ne présentant pas la même capacité dégradante coexistent dans le *consortium*. A l'issue du 37<sup>ème</sup> cycle de culture, une modification de la composition du potentiel génétique de la population SR38 est observée. En effet, le gène  $atzC$ , perdu dès le premier cycle de culture, est détecté dans 96% des colonies testées. A ce stade, deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette observation : (i) une sous-population minoritaire (<1/14) de SR38 ayant gardé le gène  $atzC$  est, pour une raison qui reste à déterminer, devenue majoritaire, (ii) ou un transfert horizontal du gène  $atzC$  a eu lieu entre *Arthrobacter* sp. TES et *Chelatobacter* sp. SR38.

## 5. Conclusions – Perspectives

L'objectif de ce chapitre est de développer et d'évaluer un outil permettant d'étudier la plasticité génétique de la communauté microbienne dégradant l'atrazine. Dans cet objectif, des souches dégradant l'atrazine et/ou l'acide cyanurique ont été choisies pour constituer les populations élémentaires d'un *consortium* dégradant. Afin de pouvoir les sélectionner spécifiquement non seulement pour les dénombrer mais aussi pour caractériser d'éventuels réarrangements génétiques, des souches résistantes à des antibiotiques ont été sélectionnées : *Variovorax* sp. 38R ( $atzAB$ ), *Chelatobacter* sp. SR38 ( $atzABC$ ,  $trxD$ ), *Pseudomonas* sp. ADPE ( $atzDEF$ ) et *Arthrobacter* sp. TES ( $trxN$ ,  $atzBC$ ). Elles ont été utilisées pour établir un *consortium* synthétique soumis à une expérience d'évolution.

Pendant les 27 premiers cycles de culture, la composition spécifique du *consortium*, estimée par l'évaluation de l'abondance des quatre populations microbiennes, était stable. Cette observation suggère que, pendant cette phase, chaque population semblait avoir trouvé sa niche écologique (ici définie dans le sens de « niche alimentaire » par le substrat consommé par la population bactérienne), et s'être maintenue à des densités suffisamment élevées pour ne pas être perdue par dilution lors du renouvellement du milieu de culture. Cette observation va plutôt à l'encontre des hypothèses que nous avons émises *a priori*. En effet, les populations microbiennes étant redondantes pour certaines étapes de la transformation de l'atrazine, (ex : 38R/SR38/TES pour la voie haute et SR38/ADPE pour la voie basse), on peut supposer qu'elles soient concurrentes.



Par conséquent, en conditions de concurrence fixée par l'accès au substrat, on pourrait facilement imaginer qu'un nombre restreint de populations se développe au détriment des autres. Ainsi, *Arthrobacter* sp. TES ( $trzNBC$ ) et *Pseudomonas* sp. ADPE ( $atzDEF$ ) pourraient entièrement utiliser l'atrazine. Cependant, bien qu'elles se soient maintenues à une abondance élevée, conservant à l'identique leur potentiel génétique, elles n'ont pas éliminé les deux autres populations constituant le *consortium*. Cette observation suggère que le principe de la sélection de la population la plus apte n'est pas vérifié ici. Une hypothèse pouvant l'expliquer est qu'en fait, les populations microbiennes formant le *consortium* occupent des niches écologiques différentes et qu'en conséquence, leur fonctionnement est intimement lié par des échanges trophiques. Cette hypothèse rejoint celle de la coopération métabolique émise par Crowley *et al.* (2005).

Le maintien des populations de *Chelatobacter* sp. SR38 et de *Variovorax* sp. 38R au sein du *consortium* sous forme hétérogène, avec des sous-populations contenant des potentiels génétiques dégradant variés  $atzA$ ,  $atzB$ ,  $atzAB$ , ou aucun gène  $atz/trz$ , arguent en faveur de l'hypothèse de l'occupation de différentes niches écologiques. Ainsi, la population de *Chelatobacter* sp. SR38, qui possédait pourtant au début de l'expérience l'ensemble des gènes permettant la dégradation ultime de l'atrazine, a perdu les gènes  $atzC$  et  $trzD$ , et a toujours été présente en plus faible densité que les autres populations. Notons que ces deux gènes sont localisés sur un même plasmide (Devers *et al.* 2007) et que leur perte peut donc correspondre à la perte du plasmide par la population. La recherche des gènes  $atz$  et  $trz$  parmi les colonies dénombrées a permis de montrer que quelle que soit la population considérée (38R ou SR38), les sous-populations majoritaires étaient celles sans gènes de dégradation ou celles possédant le gène  $atzB$ . Le cas des sous-populations sans gène, suggère qu'elles pourraient consommer des produits secondaires issus de la croissance des autres populations présentes dans le *consortium*. Si c'est le cas, il paraît alors normal d'en avoir autant en fin de culture quand la totalité de l'atrazine est consommée et que la croissance ne peut se faire que sur d'autres métabolites bactériens. Dans le cas des autres sous-populations, le fait que celles possédant  $atzB$  soient majoritaires par rapport à celles possédant  $atzA$  laisse suggérer que l'étape catalysée par ce gène pourrait être limitant dans le *consortium*, offrant ainsi une plus grande niche écologique aux populations possédant  $AtzB$  ( $atzB$  ou  $atzAB$ ). Cela suggère également que l'hydroxyatrazine résultant de la déhalogénéation catalysée par  $AtzA$  ou  $TrzN$ , soit relarguée dans le milieu extracellulaire lors de la dégradation de l'atrazine par les autres cellules. Par ailleurs, prenant en compte l'observation de De Souza *et al.* (1998) qui avaient montré qu' $AtzB$  était aussi capable de transformer l'atrazine en hydroxyatrazine mais avec une efficacité moindre qu' $AtzA$ , il est possible que les souches SR38 et 38R soient capables de transformer l'atrazine. Lors d'une étude précédente menée au laboratoire, il avait été montré que



l'amélioration de la compétitivité de la population *Pseudomonas* sp. ADP (pADP1 *atz*<sub>1</sub>ABCDEF) pour la croissance sur milieu MSA<sub>30</sub> reposait sur la duplication du gène *atz*<sub>1</sub>B (Devers *et al.* 2008). L'interprétation de ce résultat était que la duplication du gène *atz*<sub>1</sub>B, non régulé au niveau transcriptionnel, contribuait à un « effet dosage » de gène améliorant la capacité de transformation de l'hydroxyatrazine catalysée par AtzB par ailleurs identifiée comme une étape limitante de la minéralisation de l'atrazine. Par conséquent, la sélection de sous-populations de 38R et de SR38 portant le gène *atz*<sub>1</sub>B au sein du *consortium* est une réponse adaptative en concordance avec celle observée chez la population *Pseudomonas* sp. ADP (Devers *et al.*, 2007).

A partir du 31<sup>ème</sup> cycle de culture, la composition spécifique du *consortium*, jusqu'ici stable, subit pour une raison indéterminée, une modification notable avec la diminution significative de l'abondance de la population d'*Arthrobacter* sp. TES. Cette tendance semble s'inscrire dans le temps puisque, dès lors, la densité de la population d'*Arthrobacter* sp. TES n'a cessé de décroître, perdant 3 log en 6 cycles de culture. Bien que la diminution de l'abondance d'*Arthrobacter* sp. TES soit notable sur cette période, l'abondance des autres populations reste stable. La diminution de l'abondance de cette population est d'autant plus surprenante qu'étant donné la faible représentation du gène *atz*<sub>1</sub>A au sein du *consortium*, elle est la seule à pouvoir réaliser la déhalogénéation de l'atrazine, étape indispensable à la dégradation subséquente de l'hydroxyatrazine. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette observation, parmi lesquelles la concurrence avec les autres populations capables de transformer l'hydroxyatrazine. Dans tous les cas, l'efficacité des populations TES N0 et N37 pour transformer l'atrazine devra être vérifiée.

Par ailleurs, de manière intéressante, nous avons observé une autre modification apparue au 37<sup>ème</sup> cycle de culture. Le gène *atz*<sub>1</sub>C, qui avait disparu des sous-populations majoritaires de *Chelatobacter* sp. SR38, est de nouveau détecté au sein de la grande majorité des colonies de *Chelatobacter* sp. SR38. Cette observation ne semble pas directement liée à la chute de l'abondance de la population TES. Deux hypothèses sont émises pour expliquer la détection du gène *atz*<sub>1</sub>C : il y a eu soit (i) sélection d'une sous-population jusqu'alors minoritaire de *Chelatobacter* sp. SR38 ayant conservé ce gène, soit (ii) acquisition du gène *atz*<sub>1</sub>C par transfert horizontal depuis *Arthrobacter* sp. TES (*trz*<sub>1</sub>N *atz*<sub>1</sub>BC). Le gène *atz*<sub>1</sub>C chez *Chelatobacter* sp. SR38 se situait sur un plasmide contenant également *trz*<sub>1</sub>D. Le fait de ne recouvrer qu'*atz*<sub>1</sub>C irait plutôt en faveur de la seconde hypothèse. Des Southern blots et des hybridations de profil plasmidique de *Chelatobacter* sp. SR38 avec une sonde ciblant *atz*<sub>1</sub>C, voire le séquençage du gène *atz*<sub>1</sub>C d'*Arthrobacter* sp. TES et de *Chelatobacter* sp. SR38 devraient nous permettre de trancher en faveur d'une de ces hypothèses.



# **DISCUSSION GENERALE & CONCLUSIONS**



## DISCUSSION GENERALE

Au cours du siècle dernier l'évolution des pratiques agricoles a conduit à une progression sans précédent des rendements des cultures végétales et de la production animale ayant permis à l'humanité de se développer pour atteindre le chiffre vertigineux de 7 milliards d'habitants au 31 octobre 2011 selon les chiffres fournis par l'Organisation des Nations Unies (ONU). Ainsi, en cinquante ans, la production de blé tendre est passée de 16 quintaux par hectare et par an à 82 quintaux. Cette progression remarquable est la résultante d'innovations dans les domaines de (i) l'amélioration génétique des espèces cultivées, (ii) du machinisme agricole, (iii) de l'organisation socio-économique des exploitations agricoles (remembrement), (iv) de la nutrition minérale des plantes (engrais azoté et phosphaté) et (v) de la protection des cultures et des récoltes par des produits de protection des plantes (PPP encore appelés produits phytosanitaires ou pesticides). La synergie de ces innovations a conduit à révolutionner les pratiques culturales permettant de mettre en culture des terres peu propices à la production végétale. Ainsi, la France dispose de la surface agricole utile (SAU) la plus importante en Europe avec 31 millions d'hectares et consomme environ 80 000 tonnes de pesticides par an. La pression exercée par les cultures sur l'environnement est maintenant reconnue et l'impact des intrants chimiques utilisés en agriculture est connu du grand public avec notamment (i) le développement récurrent d'algues vertes sur les côtes françaises en raison de la contamination des cours d'eau avec de l'azote ou encore (ii) la contamination des aquifères avec des résidus de pesticides mettant en péril la potabilité de l'eau. Fort de ce constat, l'Europe a révisé la directive cadre sur l'eau (DCE) et a imposé à ses états membres de ne plus considérer uniquement la potabilité des eaux destinées à la consommation humaine mais aussi de prendre en considération la qualité chimique et écologique des masses d'eau. Dans ce contexte, l'état Français *via* le Grenelle de l'Environnement a adopté des mesures drastiques pour atteindre les objectifs de la DCE en imposant notamment la réduction de 50% l'utilisation des pesticides en agriculture. Par ailleurs, via la mise en place du Plan Ecophyto 2018, des efforts sont actuellement conduits pour développer de nouveaux itinéraires techniques agricoles moins dépendant des intrants chimiques. Toutefois, le zéro pesticide ne pouvant être atteint immédiatement, il est nécessaire de contrôler le devenir des pesticides qui seront apportés dans les cultures. Il s'agira de réduire leur persistance dans l'environnement et de favoriser leur dissipation en dehors des parcelles agricoles. Dans ce contexte, l'un des éléments clés à prendre en compte, est la composante microbienne des sols qui assure la transformation des intrants chimiques. Elle assure la partie biotique de la fonction écosystémique filtre du sol qui permet d'épurer une partie des contaminants apportés sur les sols. De nombreuses études ont montré



que la capacité épuratrice de la composante microbienne des sols évoluait suite à l'exposition répétée aux intrants chimiques. Ainsi, une fraction de la microflore acquiert le potentiel génétique codant l'arsenal enzymatique permettant de dégrader le pesticide et de l'utiliser comme une source de C et d'énergie. Ce phénomène, dit d'adaptation à la biodégradation accélérée (BDA), présente un intérêt environnemental puisqu'il diminue la persistance des pesticides dans les sols et en conséquence leur dispersion dans les différents compartiments de l'environnement depuis la parcelle agricole, mais il présente aussi un désavantage d'ordre agronomique puisqu'il peut, dans certains cas, diminuer l'efficacité du pesticide. Reposant en grande partie sur la plasticité génétique des populations bactériennes, les processus conduisant à la mise en place de la BDA restent assez peu décrits. Dans ce contexte, mon sujet de thèse consistait à apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes impliqués dans la dynamique adaptative des communautés microbiennes dégradant des pesticides. Pour conduire mes recherches, j'ai ciblé des populations microbiennes dégradant l'atrazine, étudiées en détails depuis de nombreuses années par mon laboratoire d'accueil. J'ai développé une approche intégrative considérant les différents niveaux d'organisation du vivant en allant (i) du niveau infra-cellulaire (gène, enzyme de dégradation), (ii) en passant par le niveau cellulaire et populationnel de souches dégradantes (iii) pour finir par étudier les mécanismes adaptatifs à l'échelle des communautés dégradantes.

**Axe 1 : Diversité génétique du gène *atzA* au sein de populations microbiennes dégradant l'atrazine : impact sur l'activité catalytique des chlorohydrolases et conséquence sur l'évolution des populations dégradant l'atrazine.**

Les gènes *atz* codant les enzymes catalysant la dégradation de l'atrazine ont été décrits chez la souche *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum *et al.*, 1995; Martinez *et al.*, 2001). De nombreuses études d'écologie des communautés microbiennes dégradant l'atrazine ont montré que ces gènes étaient dispersés dans différents fonds génétiques et très conservés (Devers *et al.*, 2007a). Le gène *atzA* codant la première enzyme de la voie de dégradation de l'atrazine est une chlorohydrolase. Comme pour d'autres pesticides halogénés (2,4-D, DDT,...), la déchloration de l'atrazine est reconnue comme une étape limitante du processus de biodégradation. L'expression de ce gène n'étant, à notre connaissance, pas régulée transcriptionnellement, une amélioration de la déchloration de l'atrazine pourrait résider dans l'accumulation de mutations génétiques conduisant à l'amélioration des performances de l'enzyme AtzA. En effet, les mutations sont susceptibles de modifier la conformation tridimensionnelle de la protéine et ses caractéristiques biochimiques. Récemment, des travaux ont montré que le gène *triA* caractérisé chez *Pseudomonas*



sp. strain NRRL B-12227, similaire à 98% avec le gène *atzA*, codait la mélamine désaminase dégradant la mélamine en amméline et ammélide (Seffernick *et al.*, 2001). TriA diffère d'AtzA par seulement 9 acides aminés ; la première est capable de désaminer la mélamine tandis que la seconde déhalogène l'atrazine. Sur la base de cette étude, il a été suggéré qu'*atzA* dériverait de *triA*. La chlorohydrolase catalysant la première étape de la dégradation de l'atrazine n'ayant pas été cristallisée, les clefs de son fonctionnement restaient méconnues. En 2009, une équipe australienne a tenté d'élucider cette problématique en utilisant des techniques de modélisation bioinformatique permettant de prédire la structure et le fonctionnement de cette enzyme (Khurani *et al.*, 2009). Au cours de cette étude, plusieurs acides aminés clefs impliqués dans la fixation du substrat ou sa catalyse ont été identifiés.

Dans la perspective d'évaluer la diversité biochimique d'AtzA, le gène *atzA* de différentes populations microbiennes isolées de régions géographiquement distinctes (Rousseaux *et al.*, 2001; Devers *et al.*, 2007a) et divergeant taxonomiquement, a été amplifié et séquencé. L'analyse des séquences nucléotidiques a montré que ces séquences étaient très conservées (de 99 à 100% de similarité) confirmant les observations précédentes obtenues à partir de souches dégradant l'atrazine (Cai *et al.*, 2003 ; Rousseaux *et al.*, 2003, Martin-Laurent *et al.*, 2006). L'analyse des séquences d'acides aminés déduites d'AtzAWT, AtzACh et AtzAPs a permis d'identifier 4 acides aminés divergents de la séquence décrite chez *Pseudomonas* sp. ADP (Accession Genbank U66917) : 3 [V92L, A296T et A170T] dans la séquence d'AtzA de *Chelatobacter heintzii* et 1 [M155V] dans la séquence d'AtzA de *Pseudomonas* sp. ADP strain MSE). Grâce à une collaboration avec l'équipe du CSIRO dirigée par le Dr Colin Scott, nous avons pu modéliser la structure des différentes isoformes AtzA. De manière intéressante, trois des acides aminés mutés ont pu être localisés dans le modèle : la mutation M155V est située dans le site actif, la mutation V92L est située dans la zone de fixation de l'atrazine et A296T dans une région impliquée dans la liaison avec le résidu histidine impliqué dans la fixation du métal. Par conséquent, l'implication fonctionnelle de ces mutations est probablement importante et pourrait expliquer la fixation de ces mutations dans différents fonds génétiques. Afin de vérifier cette hypothèse, l'activité des différentes isoformes d'AtzA a été mesurée. Par ailleurs, par une approche de mutagenèse dirigée, l'importance des mutations sur l'activité de l'enzyme AtzA a été évaluée. Ainsi, les quatre mutations distinguant AtzAWT, AtzACh et AtzAPs affectent le fonctionnement de l'enzyme. Ces mutations induisent des changements de la spécificité de l'enzyme de l'atrazine vers la simazine, des différences dans la stabilité thermique de l'enzyme et dans la constante de dissociation avec le Fe<sup>2+</sup>.



De manière intéressante, du point de vue évolutif, deux conclusions principales peuvent être énoncées :

- la mutation M155V observée chez *atzA<sub>P8</sub>*, diminue de manière significative l'activité de l'enzyme AtzA vis-à-vis de l'atrazine mais aussi de la simazine. Cette souche étant cultivée depuis de très nombreuses années sous une pression de sélection continue avec l'atrazine, il est probable que la pression de sélection pour obtenir des chlorohydrolases performantes se soit relâchée. Toutefois, il est probable qu'il existe des mécanismes de contre sélection de mutations dans le gène *atzA* étant donné que seulement une mutation a été observée après plus d'une quinzaine d'années de cultures répétées au laboratoire. Parmi les hypothèses qui peuvent être évoquées pour expliquer la contre sélection de mutation dans le gène *atzA*, on peut invoquer d'autres rôles joués par l'enzyme AtzA au niveau intra-cellulaire tel que la transformation de nucléotides.

- les mutations accumulées dans AtzACh conduisent à une activité plus forte vis-à-vis de la simazine que l'isoforme AtzAWT. Cette observation inattendue pourrait s'expliquer par le gain de fitness représenté par l'accès à la simazine qui représente jusqu'à 0,5% de l'atrazine.

Ces observations confirment que le gène *atzA* dériverait du gène *triA* et que ce gène est encore en phase évolutive. Cependant, l'évolution de ce gène semble contrainte puisque finalement assez peu de mutations sont observées. Par ailleurs, toutes les séquences d'*atzA* amplifiées d'isolats de *Chelatobacter heintzii* isolés de différents sols agricoles français sont identiques. Si j'ai pu apporter des éléments de discussion montrant l'importance de ces mutations dans le fonctionnement d'AtzA, mes résultats ne permettent pas d'élucider l'origine évolutive des mutations. Ont-elles été générées de manières indépendantes et fixées dans différents fonds génétiques ? Si tel était le cas alors nous pourrions conclure que l'évolution du gène *atzA* est très contrainte et que seules les mutations conférant un avantage ont été retenues induisant un phénomène de convergence génétique. *A contrario*, il se pourrait que ces mutations soient apparues dans une population puis qu'elles aient été transmises par transfert horizontal de gènes à d'autres populations microbiennes géographiquement éloignées. Même si la barrière géographique ne semble pas constituer un obstacle majeur à la dispersion des populations microbiennes dégradant l'atrazine (Arbeli and Fuentes, 2010), cette hypothèse peut paraître improbable et, de plus, elle pose la question du vecteur de transfert des gènes et/ou des populations dégradantes.

Au-delà des analyses conduites sur le gène *atzA*, cette étude pose la question de la diversité des autres gènes de dégradation notamment des gènes *atzB* et *atzC* et dans une moindre mesure des



gènes *atzDEF* organisés en opéron et dont l'expression est régulée par le gène *atzR*. Des études complémentaires devront être conduites dans cette perspective.

**Axe 2 : Approche d'écologie évolutive in vitro: évolution du potentiel génétique de populations microbiennes dégradantes soumises à la pression de sélection de l'atrazine et de l'acide cyanurique.**

L'adaptation à la biodégradation accélérée des communautés microbiennes du sol est observée dans des sols agricoles régulièrement exposés aux produits phytosanitaires. Ce phénomène a été observé dès la fin de la seconde guerre mondiale par Audus (1949) qui rapportait la minéralisation du 2,4-D. Depuis ce phénomène a été mis en évidence pour d'autres herbicides tels que le carbofuran (Desaint *et al.*, 2000), l'atrazine (Houot *et al.*, 2000), l'isoproturon (Cox *et al.*, 1996), le diuron (Cullington and Walker, 1999). Pendant plusieurs décennies, la mise en place de la biodégradation accélérée d'un herbicide était perçue comme un problème agronomique responsable de la diminution de l'efficacité de l'herbicide. Aujourd'hui, si ce problème agronomique peut toujours persister, le phénomène de biodégradation accélérée apparaît plutôt sous un jour salvateur contribuant à diminuer la persistance des pesticides dans le sol et par conséquent, leur dispersion dans les différents compartiments de l'environnement. Ainsi, ce phénomène assure la contribution biotique du service écosystémique filtre rempli par les sols agricoles et il a, de ce point de vue, une valeur environnementale mais aussi économique. Si le processus de biodégradation accélérée a été observé pour différents pesticides dans différents sols agricoles de part le monde, les processus adaptatifs dont il découle restent assez peu documentés. La seconde partie de ma thèse a consisté à évaluer la plasticité de la voie de dégradation de l'atrazine. La pression de sélection exercée par le pesticide sur la microflore du sol étant le facteur dirigeant le processus adaptatif conduisant à la mise en place de la biodégradation accélérée, j'ai mis en place des expériences d'évolution expérimentale pour évaluer la plasticité du potentiel génétique dégradant de la population modèle *Pseudomonas* sp. ADP minéralisant l'atrazine. Deux types de pression de sélection ont été testés ; (i) le premier exercé par l'acide cyanurique (intermédiaire métabolique de l'atrazine) consistait à appliquer la pression de sélection sur la voie basse constituée des gènes *atzDEF*, (ii) le second exercé par l'atrazine à une concentration élevée consistait à exercer la pression sur l'ensemble de la voie métabolique.

La pression de sélection exercée par l'acide cyanurique a conduit à la sélection d'une population microbienne nouvellement évoluée (ADPE) présentant une aptitude à croître sur le milieu minéral additionné d'acide cyanurique plus élevée que celle de la souche originelle (ADPO) (Changey *et al.*, 2011). L'analyse du potentiel génétique dégradant d'ADPE a permis de mettre en



évidence la délétion par recombinaison homologue d'une région de 47 kb du plasmide pADP1 comprenant les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC*. La délétion résulte d'une recombinaison homologue entre deux zones de 110 pb distante de 47kb (*pdbL* like et IS*Pps1*). La localisation de la recombinaison est inattendue : en effet, bien que cette région soit encadrée d'IS présentant des pourcentages d'identité de 100% et ce, sur des milliers de pb, la recombinaison a pris place sur des séquences de 110 pb situées dans un fragment annoté *pdbL* like. Notons que le fragment *pdbL* like n'a pas été annoté de façon correcte puisqu'il s'agit en fait d'un gène suivi d'une IS tronquée.

Les populations ADPO et ADPE présentant des aptitudes similaires pour dégrader l'acide cyanurique, l'avantage adaptatif lié à la délétion résiderait dans l'élimination du fardeau génétique constitué par la région de 47 kb. Ainsi, l'expression des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* n'est pas régulée au niveau transcriptionnel (Devers *et al.*, 2004) et en conséquence, les protéines AtzA, AtzB et AtzC sont constamment synthétisées. En l'absence d'atrazine, le maintien de la voie haute représente donc un coût énergétique et l'élimination de ce fardeau génétique, confère un avantage adaptatif à la population nouvellement évoluée sans toutefois affecter le potentiel de dégradation de l'acide cyanurique. Cette observation est en accord avec la théorie d'expansion-rétractation des génomes microbiens expliquant pourquoi la taille des génomes microbiens reste relativement stable (Zinser *et al.*, 2003). Ainsi, la pression de sélection exercée par l'atrazine favorise le recrutement de gènes codant les enzymes de dégradation apportant un gain de compétitivité aux populations les hébergeant en raison de l'accès à une nouvelle ressource énergétique dans un milieu hétérotrophe tel que le sol. *A contrario*, en absence de la pression de sélection exercée par l'atrazine, la perte sélective des gènes, représentant un fardeau génétique, constitue un avantage sélectif. Il est probable que ce scénario soit à moduler : en effet, si les gènes *atzABC* avaient été régulés transcriptionnellement alors le coût de leur maintien aurait été limité et en conséquence, leur maintien en conditions défavorables n'aurait probablement pas été contre-sélectionné.

Cette expérience évolutive met en évidence que la plasticité génétique des procaryotes confère une flexibilité adaptative remarquable aux populations microbiennes telluriques permettant de moduler leur arsenal enzymatique pour tirer bénéfice des niches écologiques qu'elles colonisent. Cette observation pose la question du maintien d'une fonction alternative, telle que l'aptitude à biodégrader un xénobiotique, dans l'environnement. Au regard des résultats que je rapporte ici, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle la fonction de biodégradation présente un caractère versatile et que son maintien dépend du niveau d'exposition des populations dégradantes aux xénobiotiques. Du point de vue environnemental, cette hypothèse est paradoxale puisqu'elle signifie que la capacité épuratrice du sol est proportionnelle à son niveau de contamination.



L'exposition au pesticide étant le facteur clef de l'adaptation à la biodégradation accélérée des pesticides, nous avons conduit une expérimentation d'évolution consistant à exposer la population de *Pseudomonas* sp. ADP T34 (Devers *et al.*, 2008) à une concentration élevée d'atrazine dans la perspective d'étudier les processus éventuels conduisant à l'optimisation des capacités de dégradation de l'atrazine. L'expérience a conduit à la sélection d'une population microbienne (ADP T100) ayant intégré le plasmide ADP1 dans le chromosome. A ce stade, l'analyse que nous avons conduite permet de conclure qu'une partie en amont des premiers gènes de dégradation (*traC*) est absente sur le chromosome. Le phénomène lié à l'insertion du plasmide relève de la recombinaison homologue entre des zones du chromosome et du plasmide. Cependant, pour l'instant, le site d'insertion chromosomique n'est pas connu. Des travaux devront être conduits pour cloner et séquencer le fragment de 230 kb contenant le plasmide ADP1 intégré au chromosome. L'observation de l'intégration du plasmide catabolique ADP1 dans le chromosome de *Pseudomonas* sp. ADP T100 est à notre connaissance originale. Si ce mécanisme a pu être observé sur d'autres modèles expérimentaux, il n'existe que peu de résultats d'évolution expérimentale le mettant en évidence, la plupart des observations résultant d'analyses *in silico* menées sur des génomes complets (Van der Meer and Sentchilo 2003). Cette observation pose la question de la nature du plasmide ADP1. En effet, ADP1 est un élément extra-chromosomique comportant une origine de répllication (Martinez *et al.* 2001) et pouvant être échangé par conjugaison bactérienne (Devers *et al.* 2005). De ce point de vue il remplit les conditions nécessaires pour être qualifié de plasmide. En revanche, ADP1 comporte des gènes codant pour des enzymes cataboliques mais aussi de nombreux éléments d'insertion (*IS1071*, *IS*Pps1**) et des séquences codant des intégrases situées dans la région après l'opéron *at*z*DEF*. Ainsi, une des deux séquences d'intégrase trouvées sur ADP1 présente jusqu'à 69% d'identité avec différentes intégrases de bactéries à Gram négatif et 65% d'identité avec des intégrases de phage. Dans ce contexte, ADP1 constituerait plutôt un élément génétique mobile (MGE) qui pourrait être qualifié d'ICE (Integrative and Conjugative Element), si on considère la définition fournie par van der Meer (2003). 'The term ICElands refers to a group of mobile DNA elements, which historically had been given different names (conjugative transposons, genomic islands and integrative plasmids)'. Pour résumer, ADP1 est un plasmide conjugatif qui comporte des transposons dont l'activité a été démontrée et selon notre dernière expérience pourrait aussi constituer un plasmide intégratif. De plus, la présence d'intégrase de type phagique laisse à penser qu'il puisse aussi être mobilisé par transduction. La mobilisation du gène *tr*z*N*, un homologue du gène *at*z*A*, par des phages a récemment été rapportée (Ghosh *et al.*, 2008). Hélas, le plasmide ADP1 est à ce jour le seul plasmide catabolique impliqué dans la dégradation de l'atrazine



séquencé entièrement et son histoire évolutive ne peut pas être tracée par une analyse *in silico* conduite sur d'autres plasmides. Il est toutefois probable que, comme pour d'autres MGEs codant pour des enzymes impliquées dans la biodégradation de différents xénobiotiques, leur histoire résulte d'événements évolutifs multiples.

Toutefois, malgré l'intérêt de notre observation en terme mécanistique, l'avantage sélectif conféré par l'insertion chromosomique du plasmide ADP1 n'est pas encore identifié. Ainsi, les populations ADP T34 et T100 possèdent des cinétiques de croissance identiques aussi bien sur milieu riche que sur milieu minéral additionné d'atrazine. Ces populations semblent toutefois différer de part leur propriété dégradante, ADP T100 présentant un taux de minéralisation plus élevé qu'ADP T34, sans toutefois avoir de répercussion notable sur la cinétique de croissance de ces deux populations. Il semble donc, qu'à priori, l'avantage sélectif conféré par l'insertion chromosomique ne soit pas lié à une amélioration physiologique. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la sélection ADP T100. L'insertion chromosomique pourrait conférer une stabilité à la population ADP T100. En effet, pour ADP T100 le maintien de la fonction de dégradation ne nécessite que la réplication du chromosome bactérien alors que pour ADP T34 le maintien de la fonction passe par la réplication et l'héritage du plasmide. Les expériences menées précédemment ont montré que le plasmide pouvait facilement être remanié quand la pression de sélection exercée par l'atrazine diminuait. Par conséquent, en fin de phase exponentielle, quand l'atrazine devient moins abondant, il est possible qu'une sous population sans plasmide puisse émerger. Même si la stabilité de l'insertion chromosomique d'ADP1 reste à évaluer, il est probable que l'insertion confère de la stabilité dans la transmission verticale de la fonction de dégradation. Sur plus de 1000 générations ce facteur pourrait expliquer la sélection d'ADP T100. Dans la perspective de tester la performance de chacune de ces deux populations, nous envisageons de mettre en place une expérience de compétition dans laquelle la survie des deux populations sera évaluée. En effet, si on considère que ces deux populations présentent des aptitudes de croissance et de dégradation similaires alors la sélection de l'une par rapport à l'autre pourrait résider dans sa capacité de survie en phase plateau lorsque l'atrazine a été entièrement consommée.

Pour conclure, ces deux expériences d'évolution ont permis de montrer l'importance de la plasticité génétique des procaryotes dans l'adaptation à la biodégradation de xénobiotique. La vitesse d'acquisition et de perte des gènes de dégradation à l'échelle d'une population dégradante semble élevée et dans ces conditions, on peut se demander comment la fonction de dégradation peut être maintenue au sein de la communauté dégradante. Dans l'objectif d'explorer cette



perspective, j'ai développé dans la dernière partie de mes travaux de thèse un outil expérimental pour évaluer l'évolution du potentiel génétique dégradant au sein d'une communauté microbienne dégradant l'atrazine.

### **Axe 3 : Approche communautaire : construction d'un outil pour évaluer l'évolution du potentiel génétique d'une communauté microbienne dégradant l'atrazine.**

Les études conduites au laboratoire depuis plusieurs années semblent indiquer que la fonction de biodégradation est partagée au sein de la communauté dégradante (Martin-Laurent *et al.*, 2006; Udiković-Kolić *et al.*, 2011). Smith *et al.* (2005) ont les premiers proposé le concept de coopération métabolique pour la biodégradation de l'atrazine. Le principe de ce concept repose sur le partage des coûts et des bénéfices du maintien de la fonction de biodégradation. Il fait aussi appel au principe d'expansion-rétraction des génomes microbiens évoqué ci-dessus dans le sens où les gènes dégradants sont échangés entre les populations constituant la communauté dégradante au grès de l'évolution de leur exposition au xénobiotique. Afin de décrire l'optimum de la fonction de biodégradation en fonction de leur exposition, j'ai développé un outil pour évaluer l'évolution du potentiel génétique d'une communauté microbienne dégradant l'atrazine. Il s'agit d'un *consortium* dégradant synthétique pour lequel chacun des membres le constituant peut être dénombré sur un milieu spécifique additionné d'antibiotiques et de suivre l'évolution de leur potentiel génétique dégradant.

Pour conduire ces développements, j'ai été impliqué dans la caractérisation d'*Arthrobacter* sp. TES6, un isolat bactérien dégradant l'atrazine d'un sol agricole Egyptien (El Sebai *et al.*, 2011). Cette souche bactérienne présente un potentiel génétique dégradant constitué par les gènes *trzN*, *atzBC* confirmant la vaste dispersion de cette combinaison génétique à travers le globe comme l'ont suggéré Arbeli and Fuentes (2010).

Les résultats préliminaires présentés indiquent que l'outil développé est fonctionnel, la composition du *consortium* pouvant être suivi et la composition génétique de chacun des membres évaluée. Les premières analyses indiquent que, contrairement à l'hypothèse initialement formulée, dans des conditions d'exposition à l'atrazine élevée, les quatre populations semblent se maintenir, et ce malgré leurs redondances fonctionnelles. Par ailleurs, la composition du potentiel génétique dégradant semble dans son ensemble assez stable. Toutefois, dans les derniers cycles de culture des changements dans la composition du *consortium* mais aussi dans la composition du potentiel génétique dégradant des populations le constituant ont été observés laissant entrevoir des perspectives intéressantes. Ces premiers résultats semblent confirmer l'hypothèse de coopération



métabolique qui va à l'encontre de la sélection de la population la plus apte à minéraliser l'atrazine évoquée dans les chapitres précédents.

Le dispositif expérimental devra être parfait notamment avec l'inclusion de contrôle et de répétitions de manière à tester l'impact de différents niveaux d'exposition sur l'évolution du *consortium* dégradant.



## CONCLUSION

Ce travail nous a permis de comprendre que l'évolution de la voie de dégradation de l'atrazine(i) s'effectuait à différentes échelles génétiques et phénotypiques (ii) n'était pas « parfaite » puisque glissant toujours vers l'*optimum* climassique. Le genre bactérien semble être également un bon comptable puisque, s'il est capable d'investir de l'énergie dans l'acquisition et l'amélioration d'une voie de dégradation il est également capable de s'en débarrasser en cas de « non retour sur investissement ». L'atrazine constitue toujours un excellent modèle car sa pérennisation dans les sols en a fait un sujet d'étude presque inéluctable, néanmoins d'autres produits phytosanitaires sauront bientôt la remplacer.

L'ensemble de ces travaux peuvent participer à une meilleure compréhension des voies métaboliques mises en jeu dans la dégradation des herbicides. Car si ces derniers ont permis l'amélioration des rendements, la qualité chimique des sols et des aliments semble avoir pâti d'un principe de précautions quelques fois mal ajusté. Aussi, si les perspectives d'amélioration des techniques de dépollution des sols semblent se profiler, elles ne doivent pas constituer un palliatif dans la gestion agricole mondiale.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackerman, F.: The economics of atrazine. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, Vol 13 (2007) 437-445.
- Agertved, J., Rugge, K. and Barker, J.F.: TRANSFORMATION OF THE HERBICIDES MCPP AND ATRAZINE UNDER NATURAL AQUIFER CONDITIONS. *Ground Water* 30 (1992) 500-506.
- Aislabie, J., Bej, A.K., Ryburn, J., Lloyd, N. and Wilkins, A.: Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology* 52 (2005) 279-286.
- Allran, J.W. and Karasov, W.H.: Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (2001) 769-775.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J.: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (1990) 403-410.
- Alvey, S. and Crowley, D.E.: Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen source. *Journal of Environmental Quality* 24 (1995) 1156-62.
- Ameziane, N., Bogard, M. and Lamoril, J.: *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Elsevier, France, 2006.
- Arbeli, Z. and Fuentes, C.: Prevalence of the gene *trzN* and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from 13 Colombian agricultural soils. Blackwell, Oxford, RU, 2010.
- Arber, W.: Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* 135 (1993) 49-56.
- Armstrong, D.E., Chesters, G. and Harris, R.F.: Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 31 (1967) 61-66.
- Assaf, N.A. and Turco, R.F.: Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial *consortium* is possible in culture and soil. *Biodegradation* 5 (1994) 29-35.
- Baize, D.: *Petit Lexique de Pédologie*, Orléans, 2004.
- Bär, H.-P. and Drummond, G.I.: On the mechanism of adenosine deaminase action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 24 (1966) 584-587.
- Barrick, J.E., Yu, D.S., Yoon, S.H., Jeong, H., Oh, T.K., Schneider, D., Lenski, R.E. and Kim, J.F.: Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* 461 (2009) 1243-1247.
- Barriuso, E.: *Estimation des risques environnementaux des pesticides*, INRA Editions ed, 2004.
- Barriuso, E. and Houot, S.: Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (1996) 1341-1348.
- Barriuso, E., Houot, S. and Serra-Wittling, C.: Influence of Compost Addition to Soil on the Behaviour of Herbicides. *Pesticide Science* 49 (1997) 65-75.
- Barriuso, E., Schiavon, M., Andreux, F. and Portal, J.M.: Localization of atrazine non-extractable (bound) residues in soil size fractions. *Chemosphere* 22 (1991) 1131-1140.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K. and Kaur, S.: Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256 (2008) 2166-2174.
- Bazhanov, D. and Yatsevich, K.: Mobilization of genes for simazine degradation by the pSa plasmid. *Cytology and Genetics* 41 (2007) 12-17.
- Beare, M., Coleman, D., Crossley, D., Hendrix, P. and Odum, E.: A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil* 170 (1995) 5-22.
- Behki, R., Topp, E., Dick, W. and Germon, P.: Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 1955-1959.



- Belluck, D.A., Benjamin, S.L. and Dawson, T.: Groundwater Contamination by Atrazine and Its Metabolites, Pesticide Transformation Products. American Chemical Society, 1991, pp. 254-273.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M. and Holden, H.M.: Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* 34 (1995) 7973-7978.
- Benning, M.M., Taylor, K.L., Liu, R.-Q., Yang, G., Xiang, H., Wesenberg, G., Dunaway-Mariano, D. and Holden, H.M.: Structure of 4-Chlorobenzoyl Coenzyme A Dehalogenase Determined to 1.8 Å Resolution : An Enzyme Catalyst Generated via Adaptive Mutation. *Biochemistry* 35 (1996) 8103-8109.
- Berkovitch, F., Behshad, E., Tang, K.-H., Enns, E.A., Frey, P.A. and Drennan, C.L.: A locking mechanism preventing radical damage in the absence of substrate, as revealed by the x-ray structure of lysine 5,6-aminomutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004) 15870-15875.
- Bichat, F., Sims, G.K. and Mulvaney, R.L.: Microbial utilization of heterocyclic nitrogen from atrazine. *Soil Science Society of America Journal* 63 (1999) 100-110.
- Bidstrup, P.L. and Payne, D.J.H.: Poisoning By Dinitro-Ortho-Cresol: Report Of Eight Fatal Cases Occurring In Great Britain. *The British Medical Journal* 2 (1951) 16-19.
- Blazquez, J., Baquero, M.R., Canton, R., Alos, I. and Baquero, F.: Characterization of a new TEM-type beta-lactamase resistant to clavulanate, sulbactam, and tazobactam in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37 (1993) 2059-2063.
- Bonnet, M.: Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Université de Metz, 2000, pp. 198.
- Boundy-Mills, K.L., de Souza, M.L., Mandelbaum, R.T., Wackett, L.P. and Sadowsky, M.J.: The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 916-923.
- Bouquard, C., Ouazzani, J., Promé, J.C., Michel-Briand, Y. and Plésiat, P.: Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Appl Environ Microbiol* 63 (1997) 862-6.
- Boyd, E.F. and Brüssow, H.: Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends in Microbiology* 10 (2002) 521-529.
- Brouwer, W.W.M., Boesten, J.J.T.I. and Siegers, W.G.: Adsorption of transformation products of atrazine by soil. *Weed Research* 30 (1990) 123-128.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J.: Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3 (2000) 3-8.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.: Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. In: Kramer, K., Krayner, O., Lehnartz, E., Murali, A.v. and Weber, H.H. (Eds.), *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Volume 131. Springer Berlin Heidelberg, 1997, pp. 1-87.
- Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y. and Jiang, S.: Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Lett Appl Microbiol* 36 (2003) 272-6.
- Calvet, R.: Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ Health Perspect* 83 (1989).
- Calvet, R.: *Le sol : propriétés et fonctions*. Editions France Agricole, 2003.
- Canosi, U., Iglesias, A. and Trautner, T.A.: Plasmid transformation in *Bacillus subtilis* :Effects of insertion of *Bacillus subtilis* DNA into plasmid pC194. *Molecular and General Genetics* MGG 181 (1981) 434-440.
- Casjens, S.: Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology* 49 (2003) 277-300.
- Changey, F., Devers-Lamrani, M., Rouard, N. and Martin-Laurent, F.: In vitro evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the



- selective loss of a 47kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes. *Gene* (2011)490 18-25.
- Christie, P.J.: Type IV secretion : intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology* 40 (2001) 294-305.
- Chung, Y.S., Breidt, F. and Dubnau, D.: Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 29 (1998) 905-913.
- Chung, Y.S. and Dubnau, D.: ComC is required for the processing and translocation of ComGC, a pilin-like competence protein of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 15 (1995) 543-551.
- Chung, Y.S. and Dubnau, D.: All Seven comG Open Reading Frames Are Required for DNA Binding during Transformation of Competent *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 41-45.
- Clay, S.A. and Koskinen, W.C.: Adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine and s-glutathione atrazine on two soils. *Weed Sci.* 38 (1990) 262-266.
- Clifton, S.W., McCarthy, D. and Roe, B.A.: Sequence of the *rec-2* locus of *Haemophilus influenzae*: homologies to *comE-ORF3* of *Bacillus subtilis* and *msbA* of *Escherichia coli*. *Gene* 146 (1994) 95-100.
- Cohen, J.A.: Chemistry and Structure of Nucleic Acids of Bacteriophages. *Science* 158 (1967) 343-351.
- Cohen, S.Z., Creeger, S.M., Carsell, R.F. and Enfield, C.G.: Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses. In: Ser., A.S. (Ed.), *Treatment and disposal of pesticide wastes*, Krueger, R. F; Sieber, J. N. , 1984, pp. 259-297.
- Comber, S.D.W.: Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pesticide Science* 55 (1999) 696-702.
- Comeau, A.M. and Krisch, H.M.: The Capsid of the T4 Phage Superfamily: The Evolution, Diversity, and Structure of Some of the Most Prevalent Proteins in the Biosphere. *Molecular Biology and Evolution* 25 (2008) 1321-1332.
- Cook, A.M.: Biodegradation of s-triazines xenobiotics. *Fems Microbiology Reviews* 46 (1987) 93-116.
- Cook, A.M., Beilstein, P., Grossenbacher, H. and Hatter, R.: Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *Biochem. J.* 231 (1985) 25-30.
- Cook, A.M. and Hutter, R.: Deethylsimazine-bacterial dechlorination, deamination, and complete degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32 (1984) 581-585.
- Copley, S.D.: Evolution of efficient pathways for degradation of anthropogenic chemicals. *Nat Chem Biol* 5 (2009) 559-566.
- Coquet, Y.: Variation of pesticide sorption isotherm in soil at the catchment scale. *Pest Management Science* 59 (2003) 69-78.
- Cox, L., Walker, A. and Welch, S.J.: Evidence for the Accelerated Degradation of Isoproturon in Soils. *Pesticide Science* 48 (1996) 253-260.
- Craig, L. and Li, J.: Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology* 18 (2008) 267-277.
- Craig, N., L.: *Transposon Tn7*. Springer, Berlin, Allemagne, 1996.
- Crawford, J.J., Sims, G.K., Mulvaney, R.L. and Radosevich, M.: Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (1998) 618-623.
- Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S. and Watts-Tobin, R.J.: General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* 192 (1961) 1227-1232.
- Cullington, J.E. and Walker, A.: Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry* 31 (1999) 677-686.
- Curcio, M.J. and Derbyshire, K.M.: The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 865-877.



- Dangeard, P.A.: Recherches sur les tubercles radicaux des Légumineuses. Le Botaniste, Paris, 1926.
- Dai, X.Z., Jiang, J.D., Gu, L.F., Pan, R.Q. and Li, S.P.: Study on the atrazine-degrading genes in *Arthrobacter* sp. AG1. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 23 (2007) 789-93.
- Davet, P.: Vie microbienne du sol et production végétale. INRA Editions, 1996.
- Davison, J.: Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* 42 (1999) 73-91.
- De Souza, M., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp strain ADP: gene sequence, enzyme purification and protein characterisation. *J. Bacteriology* 178 (1996) 4894-4900.
- De Souza, M., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. and Wackett, L.: The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J Bacteriol* 180 (1998) 1951-1954.
- De Souza, M.L., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Atrazine Chlorohydrolase From *Pseudomonas* Sp. Strain Adp: Gene Sequence, Enzyme Purification, and Protein Characterization (Vol 178, Pg 4894, 1996). *Journal of Bacteriology* 181 (1999) 695.
- Desaint, S., Hartmann, A., Parekh, N.R. and Fournier, J.C.: Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 34 (2000) 173-180.
- Devers, M., Azhari, N.E., Kolic, N.-U. and Martin-Laurent, F.: Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiology Letters* 273 (2007a) 78-86.
- Devers, M., Henry, S., Hartmann, A. and Martin-Laurent, F.: Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (*atz*) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. *Pest Management Science* 61 (2005) 870-880.
- Devers, M., Rouard, N. and Martin-Laurent, F.: Genetic rearrangement of the *atzAB* atrazine-degrading gene cassette from pADP1::Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. *Gene* 392 (2007b) 1-6.
- Devers, M., Rouard, N. and Martin-Laurent, F.: Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology* 10 (2008) 676-684.
- Devers, M., Soulas, G. and Martin-Laurent, F.: Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods* 56 (2004) 3-15.
- Di Gioia, D., Peel, M., Fava, F. and Wyndham, R.C.: Structures of Homologous Composite Transposons Carrying *cbaABC* Genes from Europe and North America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 1940-1946.
- Dua, M.D., Singh, A.S., Sethunathan, N.S. and Johri, A.J.: Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2002) 143-152.
- Dubnau, D.: Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 55 (1991) 395-424.
- Dubnau, D.: Dna uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53 (1999) 217-244.
- Dubnau, D. and Cirigliano, C.: Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*: IV. The endwise attachment and uptake of transforming DNA. *Journal of Molecular Biology* 64 (1972) 31-46.
- Dupayrat, J.: Structure et nomenclature des hétérocycles Technip, Paris, 1970.
- Eaton, R.W. and Karns, J.S.: Cloning and comparison of the DNA encoding ammeline aminohydrolase and cyanuric acid amidohydrolase from three s-triazine-degrading bacterial strains. *J. Bacteriol.* 173 (1991) 1363-1366.
- Eckhardt, T.: A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1 (1978) 584-588.
- El Sebaï, T., Devers-Lamrani, M., Changey, F., Rouard, N. and Martin-Laurent, F.: Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of *Arthrobacter* sp. TES6,



- an atrazine-degrading strain. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 1249-1255.
- Erickson, L.E. and Lee, K.H.: Degradation of atrazine and related s-triazines. *Crit. Rev. Environ. Control* 19 (1989) 1-14.
- F**acijs, D. and Meyer, T.F.: Novel determinant (*comA*) essential for natural transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae* and the effect of a *comA* defect on pilin variation. *Molecular Microbiology* 10 (1993) 699-712.
- Finnegan, D.J.: Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics* 5 (1989) 103-107.
- Fornili, S.L. and Fox, M.S.: Electron microscope visualization of the products of *Bacillus subtilis* transformation. *Journal of Molecular Biology* 113 (1977) 181-191.
- Frank, R. and Sirons, G.J.: Dissipation of atrazine residues from soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 34 (1985) 541-548.
- Frey, J.S., McClellan, J.F., Ingham, E.R. and Coleman, D.C.: Filter-out-grazers (FOG): a filtration experiment for separating protozoan grazers in soil. *Biol. Fert. Soils* 1 (1985) 73-79.
- Fruchey, I., Shapir, N., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: On the Origins of Cyanuric Acid Hydrolase: Purification, Substrates, and Prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3653-3657.
- G**alas, D.J., and M. Chandler. Bacterial insertion sequences, p.I.D.E.B.a.M.M.H.e., Mobile and DNA. American Society for Microbiology, W., D.C.: Mobile DNA. D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), Washington, DC, 1989.
- García-González, V., Govantes, F., Porrua, O. and Santero, E.: Regulation of the *Pseudomonas* sp. Strain ADP Cyanuric Acid Degradation Operon. *J. Bacteriol.* 187 (2005) 155-167.
- Garcillán-Barcia, M.P. and de la Cruz, F.: Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiology Ecology* 42 (2002) 303-313.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A.: Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook* Humana Press, 2005.
- Gebendinger, N. and Radosevich, M.: Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M91-3. *Appl Environ Microbiol* 51 (1999) 375-81.
- Getenga, Z., Dorfler, U., Iwobi, A., Schmid, M. and Schroll, R.: Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere* 77 (2009) 534-539.
- Ghosh, D., Roy, K., Williamson, K.E., White, D.C., Wommack, K.E., Sublette, K.L. and Radosevich, M.: Prevalence of Lysogeny among Soil Bacteria and Presence of 16S rRNA and *trzN* Genes in Viral-Community DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 495-502.
- Giardi, M.T., Giardina, M.C. and Filacchioni, G.: Chemical and biological degradation of primary metabolites of atrazine by *Nocardia* strain. *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (1985) 1551-1558.
- Giglia-Mari, G. and Sarasin, A.: TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 21 (2003) 217-228. .
- Glotfelty, D.E., Taylor, A.W., Turner, B.C. and Zoller, W.H.: Volatilization of surface-applied pesticides from fallow soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32 (1984) 638-643.
- Griffith, F.: The Significance of Pneumococcal Types. *Epidemiology and Infection* 27 (1928) 113-159.
- Griffiths, A.F.J., Miller, H.J., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M.: *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th edition ed. W. H. Freeman and Company., New York, 2000.



- Grindley, N.D.F., Lauth, M.R., Wells, R.G., Wityk, R.J., Salvo, J.J. and Reed, R.R.: Transposon-mediated site-specific recombination: Identification of three binding sites for resolvase at the res sites of  $[\gamma][\delta]$  and Tn 3. *Cell* 30 (1982) 19-27.
- Grossman, A.D.: Genetic Networks Controlling the Initiation of Sporulation and the Development of Genetic Competence in *Bacillus Subtilis*. *Annual Review of Genetics* 29 (1995) 477-508.
- Groth, A.C. and Calos, M.P.: Phage Integrases: Biology and Applications. *Journal of Molecular Biology* 335 (2004) 667-678.
- Gurtler, V. and Stanisich, V.A.: New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142 (1996) 3-16.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. and Tschäpe, H.: Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology* 23 (1997) 1089-1097.
- Hacker, J.r. and Kaper, J.B.: Pathogenicity island and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology* 54 (2000) 641-679.
- Hahn, J., Maier, B., Hajjema, B.J., Sheetz, M. and Dubnau, D.: Transformation Proteins and DNA Uptake Localize to the Cell Poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* 122 (2005) 59-71.
- Hallet, B. and Sherratt, D.J.: Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiology Reviews* 21 (1997) 157-178.
- Haren, L., Ton-Hoang, B. and Chandler, M.: Integrating DNA: Transposases and Retroviral Integrases. *Annual Review of Microbiology* 53 (1999) 245-281.
- Hatton, P.J., Dixon, D., Cole, D.J. and Edwards, R.: Glutathione Transferase Activities and Herbicide Selectivity in Maize and Associated Weed Species. *Pesticide Science* 46 (1996) 267-275.
- Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G. and Morrison, D.A.: An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995) 11140-11144.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. and Vonk, A.: Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002) 5476-5480.
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T. and Gallipeau, S.: Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 4612-4617.
- Hillen, W. and Schollmeier, K.: Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Research* 11 (1983) 525-540.
- Huff, J. and Sass, J.: Atrazine – a likely human carcinogen? *Int. J. Occup. Environ. Health*, 13 (2007), pp. 356–358
- Horne, Irene, Sutherland, Tara, D., Harcourt, Rebecca, L., Russell, Robyn, J., Oakeshott and John, G.: Identification of an opd (Organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. American Society for Microbiology, Washington, DC, ETATS-UNIS, 2002.
- Houot, S., Topp, E., Yassir, A. and Soulas, G.: Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils. *Soil Biology & Biochemistry* 32 (2000) 615-625.
- Howard, M.T., Nelson, W.C. and Matson, S.W.: Stepwise Assembly of a Relaxosome at the F Plasmid Origin of Transfer. *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 28381-28386.



- Humburg, N.E., Colby, S.R., Lym, R.G., Hill, E.R., McAvoy, W.J., Kitchen, K.M. and Prasad, R.: *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America* 6th ed. WSSA: Champaign IL (1989) pp 17-20.
- Hummelen, J.C., Luider, T.M. and Wynberg, H.: Functionalized adamantylideneadamantane 1,2-dioxetanes: investigations on stable and inherently chemiluminescent compounds as a tool for clinical analysis. *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 639-650.
- Hussain, S., Devers-Lamrani, M., El Azhari, N. and Martin-Laurent, F.: Isolation and characterization of an isoproturon mineralizing *Sphingomonas* sp. strain SH from a French agricultural soil. *Biodegradation* 22 (2010) 637-650.
- Ireton, G.C., McDermott, G., Black, M.E. and Stoddard, B.L.: The structure of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Journal of Molecular Biology* 315 (2002) 687-697.
- Jamagne, M., Hardy, R., King, D. and Bornand, M.: La base de données géographiques des sols de France, Etude et gestion des sols, 1995, pp. 152-172.
- Jansen, M.A., Depka, B., Trebst, A. and Edelman, M.: Engagement of specific sites in the plastoquinone niche regulates degradation of the D1 protein in photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 21246-52.
- Janssen, P.H.: Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 1719-1728.
- Jeng, A.S. and Bergseth, H.: Chemical and Mineralogical Properties of Norwegian Alum Shale Soils, with Special Emphasis on Heavy Metal Content and Availability. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science* 42 (1992) 88-93.
- Jensen, H.L. and Abdel-Ghaffer, A.S.: Cyanuric acid as nitrogen source for microorganisms. *Arch. Mikrobiol.* 67 (1969) 1-5.
- Joffe, J.S.: *Pedology*. *Soil Science* 42 (1936) 313.
- Jowa, L. and Howd, R.: Should Atrazine and Related Chlorotriazines Be Considered Carcinogenic for Human Health Risk Assessment? *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 29 91-144.
- Jury, W, A., Winer, A, M., Spencer, W, F., Focht and D, D.: *Transport and transformations of organic chemicals in the soil-air-water ecosystem*. Springer, Heidelberg, ALLEMAGNE, 1987.
- Karns, J.S.: Gene Sequence and Properties of an s-Triazine Ring-Cleavage Enzyme from *Pseudomonas* sp. Strain NRRLB-12227. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3512-3517.
- Kato-Maeda, M., Rhee, J.T., Gingeras, T.R., Salamon, H., Drenkow, J., Smittipat, N. and Small, P.M.: Comparing Genomes within the Species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research* 11 (2001) 547-554.
- Kennedy, A.K., Haniford, D.B. and Mizuuchi, K.: Single Active Site Catalysis of the Successive Phosphoryl Transfer Steps by DNA Transposases: Insights from Phosphorothioate Stereoselectivity. *Cell* 101 (2000) 295-305.
- Kern, J. and Renger, G.: Photosystem II: Structure and mechanism of the water:plastoquinone oxidoreductase. *Photosynthesis Research* 94 (2007) 183-202.
- Kim, G.J. and Kim, H.S.: Identification of the structural similarity in the functionally related amidohydrolases acting on the cyclic amide ring. *Biochem. J.* 330 (1998) 295-302.
- Kolpin, D.W. and Kalkhoff, S.J.: Atrazine degradation in a small stream in Iowa. *Environmental Science & Technology* 27 (1993) 134-139.
- Kroll, J.S., Wilks, K.E., Farrant, J.L. and Langford, P.R.: Natural genetic exchange between *Haemophilus* and *Neisseria*: Intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (1998) 12381-12385.
- Kulikova, N.A. and Perminova, I.V.: Binding of Atrazine to Humic Substances from Soil, Peat, and Coal Related to Their Structure. *Environmental Science & Technology* 36 (2002) 3720-3724.



- Kulkosky, J., Jones, K.S., Katz, R.A., Mack, J.P. and Skalka, A.M.: Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 2331-2338.
- Kunkel, T.A. and Bebenek, K.: DNA REPLICATION FIDELITY1. *Annual Review of Biochemistry* 69 (2000) 497-529.
- Lanka, E. and Wilkins, B.M.: DNA Processing Reactions in Bacterial Conjugation. *Annual Review of Biochemistry* 64 (1995) 141-169.
- Lavelle, P., Begon, M. and Fitter, A.H.: Faunal Activities and Soil Processes: Adaptive Strategies That Determine Ecosystem Function, *Advances in Ecological Research*. Academic Press, 1997, pp. 93-132.
- Lawley, P.D. and Thatcher, C.J.: Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N<sup>1</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. *Biochem. J.* 116 (1970) 693-707.
- Lawrence, J.G.: Selfish operons and speciation by gene transfer. *Trends in Microbiology* 5 (1997) 355-359.
- Lawrence, J.G.: Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology* 2 (1999) 519-523.
- Lawrence P, W.: Questioning our perceptions about evolution of biodegradative enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 12 (2009) 244-251.
- Lecomte, V., Le Bissonnais, Y., Renaux, B., Couturier, A. and Ligneau, L.: Erosion hydrique et transferts de produits phytosanitaires dans les eaux de ruissellement. *Cahiers Agricultures* 6 (1997) 175-183.
- Lederberg, J. and Tatum, E.L.: Sex in Bacteria: Genetic Studies, 1945-1952. *Science* 118 (1953) 169-175.
- Lee, M.H., Kosuk, N., Bailey, J., Traxler, B. and Manoil, C.: Analysis of F Factor TraD Membrane Topology by Use of Gene Fusions and Trypsin-Sensitive Insertions. *J. Bacteriol.* 181 (1999) 6108-6113.
- Lennox, E.S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1 (1955) 190-206.
- Lesk, A.M., Brändén, C.-I. and Chothia, C.: Structural principles of  $\alpha/\beta$  barrel proteins: The packing of the interior of the sheet. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 5 (1989) 139-148.
- Li, Q.Y., Li, Y., Zhu, X.K. and Cai, B.L.: Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences-China* 20 (2008) 1226-1230.
- Li, T., Iwaki, H., Fu, R., Hasegawa, Y., Zhang, H. and Liu, A.:  $\hat{\pm}$ -Amino- $\hat{I}^2$ -carboxymuconic- $\hat{I}\mu$ -semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) Is a New Member of the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry* 45 (2006) 6628-6634.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M. and Cruz, F.d.l.: Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology* 45 (2002) 1-8.
- Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C. and Petsko, G.A.: Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry* 29 (1990) 6609-6618.
- Lorenz, M.G. and Wackernagel, W.: Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 58 (1994) 563-602.
- Lovett, C.M., Jr., Love, P.E. and Yasbin, R.E.: Competence-specific induction of the *Bacillus subtilis* RecA protein analog: evidence for dual regulation of a recombination protein. *J. Bacteriol.* 171 (1989) 2318-2322.



- Lyman, W.J.: Adsorption Coefficient for Soils and Sediments. In: Society, A.C. (Ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Washington, DC, 1990.
- Mader, D.L.: Soil Variability :A Serious Problem in Soil-Site Studies in the Northeast. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 27 (1963) 707-709.
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L. and Wackett, L.P.: Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1451-1457.
- Marsh, P. and Wellington, E.M.H.: Phage-host interactions in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 15 (1994) 99-107.
- Martin-Laurent, F., Barres, B., Wagschal, I., Piutti, S., Devers, M., Soulas, G. and Philippot, L.: Impact of the Maize Rhizosphere on the Genetic Structure, the Diversity and the Atrazine-degrading Gene Composition of Cultivable Atrazine-degrading Communities. *Plant and Soil* 282 (2006) 99-115.
- Martin-Laurent, F., Cornet, L., Ranjard, L., López-Gutiérrez, J.-C., Philippot, L., Schwartz, C., Chaussod, R., Catroux, G. and Soulas, G.: Estimation of atrazine-degrading genetic potential and activity in three French agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology* 48 (2004) 425-435.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R. and Sadowsky, M.J.: Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5684-5697.
- Martynowski, D., Eyobo, Y., Li, T., Yang, K., Liu, A. and Zhang, H.: Crystal Structure of  $\hat{\pm}$ -Amino- $\hat{\pm}^2$ -carboxymuconate- $\hat{\mu}$ -semialdehyde Decarboxylase: Insight into the Active Site and Catalytic Mechanism of a Novel Decarboxylation Reaction. *Biochemistry* 45 (2006) 10412-10421.
- Marvin, D.A. and Folkhard, W.: Structure of F-Pili: Reassessment of the symmetry. *Journal of Molecular Biology* 191 (1986) 299-300.
- Matson, S.W. and Morton, B.S.: *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a site- and strand-specific nicking reaction at the F plasmid oriT. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991) 16232-16237.
- Mazel, D. and Davies, J.: Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56 (1999) 742-754.
- Mazodier, P. and Davies, J.: Gene Transfer Between Distantly Related Bacteria. *Annual Review of Genetics* 25 (1991) 147-171.
- McClintock, B.: Mutable loci in maize., 1948.
- McDowell-Boyer, L.M., Hunt, J.R. and Sitar, N.: Particle transport through porous media. *Water Resour. Res.* 22 (1986) 1901-1921.
- McGlamery, M.D. and Slife, F.W.: The adsorption and desorption of atrazine as affected by pH, temperature, and concentration. *Weeds* 14 (1966) 237-239
- Mendiola, M.V. and de la Cruz, F.: IS91 transposase is related to the rolling-circle-type replication proteins of the pUB110 family of plasmids. *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 3521.
- Mendiola, M.V., Jubete, Y. and de la Cruz, F.: DNA sequence of IS91 and identification of the transposase gene. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 1345-1351.
- Meyer, A.H., Penning, H. and Elsner, M.: C and N Isotope Fractionation Suggests Similar Mechanisms of Microbial Atrazine Transformation Despite Involvement of Different Enzymes (AtzA and TrzN). *Environmental Science & Technology* 43 (2009) 8079-8085.
- Monard, C.: Biodégradation des herbicides en sols tempérés – Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol, UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement. Université de Rennes 1, Rennes, 2008, pp. 257.



- Monard, C., Vandenkoornhuysen, P., Le Bot, B. and Binet, F.: Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *ISME J* 5 (2011) 1048-1056.
- Moreau-Kervévan, C. and Mouvet, C.: Adsorption and Desorption of Atrazine, Deethylatrazine, and Hydroxyatrazine by Soil Components. *J. Environ. Qual.* 27 (1998) 46-53.
- Mulbry, W.W.: Purification and Characterization of an Inducible s-Triazine Hydrolase from *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 613-618.
- Mulbry, W.W., Zhu, H., Nour, S.M. and Topp, E.: The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioideis* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 206 (2002) 75-79.
- N**agano, N., Gail Hutchinson, E. and Thornton, J.M.: Barrel structures in proteins: Automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels. *Protein Science* 8 (1999) 2072-2084.
- Nagy, I., Compennolle, F., Ghys, K., Vanderleyden, J. and De Mot, R.: A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2056-2060.
- Nakatsu, C., Ng, J., Singh, R., Straus, N. and Wyndham, C.: Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (1991) 8312-8316.
- Neilson, J.W., Josephson, K.L., Pepper, I.L., Arnold, R.B., Di Giovanni, G.D. and Sinclair, N.A.: Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 4053-4058.
- Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K. and van Elsas, J.D.: Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? *FEMS Microbiology Reviews* 22 (1998) 79-103.
- Noble, A.: Partition coefficients (n-octanol--water) for pesticides. *Journal of Chromatography* 642 (1993) 3-14.
- Nunn, D., Bergman, S. and Lory, S.: Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J. Bacteriol.* 172 (1990) 2911-2919.
- O**chman, H., Lawrence, J.G. and Groisman, E.A.: Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405 (2000) 299-304.
- Ogner, G. and Schnitzer, M.: Humic Substances: Fulvic Acid-Dialkyl Phthalate Complexes and Their Role in Pollution. *Science* 170 (1970) 317-318.
- Ohtsubo, E, Sekine and Y: Bacterial insertion sequences. Springer, Berlin, ALLEMAGNE, 1996.
- Olsson, M. and Lindahl, T.: Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* 255 (1980) 10569-10571.
- Orgel, A. and Brenner, S.: Mutagenesis of bacteriophage T4 by acridines. *Journal of Molecular Biology* 3 (1961) 762-768.
- Ostrofsky, E.B., Traina, S.J. and Tuovinen, O.H.: Variation in atrazine mineralization rates in relation to agricultural management practice. *Journal of Environmental Quality* 26 (1997) 647-657.
- P**ace, N.R.: A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science* 276 (1997) 734-740.
- Palmen, R., Vosman, B., Buijsman, P., Breek, C.K.D. and Hellingwerf, K.J.: Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Gen Microbiol* 139 (1993) 295-305.
- Parnell, J.J., Rompato, G., Latta, L.C.I.V., Pfrender, M.E., Van Nostrand, J.D., He, Z., Zhou, J., Andersen, G., Champine, P., Ganesan, B. and Weimer, B.C.: Functional Biogeography as



- Evidence of Gene Transfer in Hypersaline Microbial Communities. *PLoS ONE* 5 (2010) e12919.
- Patricelli, M.P. and Cravatt, B.F.: Clarifying the Catalytic Roles of Conserved Residues in the Amidase Signature Family. *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 19177-19184.
- Pelmont, J.: Biodégradations et métabolismes : Les bactéries pour les technologies de l'environnement EDP Science, Grenoble, 2005.
- Perry, J., N., Firbank, L., G., Champion, G., T., Clark, S., J., Heard, M., S., May, M., J., Hawes, C., Squire, G., R., Rothery, P., Woiwod, I., P. and Pidgeon, J., D.: Ban on triazine herbicides likely to reduce but not negate relative benefits of GMHT maize cropping. Nature Publishing Group, London, ROYAUME-UNI, 2004.
- Pick, F.E., Vandyk, L.P. and Botha, E.: ATRAZINE IN GROUND AND SURFACE-WATER IN MAIZE PRODUCTION AREAS OF THE TRANSVAAL, SOUTH-AFRICA. *Chemosphere* 25 (1992) 335-341.
- Pieper, U., Chiang, R., Seffernick, J., Brown, S., Glasner, M., Kelly, L., Eswar, N., Sauder, J., Bonanno, J., Swaminathan, S., Burley, S., Zheng, X., Chance, M., Almo, S., Gerlt, J., Raushel, F., Jacobson, M., Babbitt, P. and Sali, A.: Target selection and annotation for the structural genomics of the amidohydrolase and enolase superfamilies. *Journal of Structural and Functional Genomics* 10 (2009) 107-125.
- Piutti, S., Hallet, S., Rousseaux, S., Philippot, L., Soulas, G. and Martin-Laurent, F.: Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biol Fertil Soils* 36 (2002) 434-41.
- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G. and Martin-Laurent, F.: Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters* 221 (2003) 111-117.
- Pogozelski, W.K. and Tullius, T.D.: Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chemical Reviews* 98 (1998) 1089-1108.
- Porter, D.J. and Austin, E.A.: Cytosine deaminase. The roles of divalent metal ions in catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 268 (1993) 24005-24011.
- Postel, E.H. and Goodgal, S.H.: Uptake of Single-stranded DNA in *Hemophilus influenzae* and its ability to transform. *Journal of Molecular Biology* 16 (1966) 317-327.
- Protzman, R., Lee, P., Ong, S. and Moorman, T.: Treatment of formulated atrazine rinsate by *Agrobacterium radiobacter* strain J14a in a sequencing batch biofilm reactor. *Water Research* 33 (1999) 1399-404.
- Pugsley, A.P.: The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57 (1993) 50-108.
- Pussemier, L., Goux, S., Vanderheyden, V., Debongnie, P., Tresinie, I. and Foucart, G.: Rapid dissipation of atrazine in soils taken from various maize fields. *Weed Research* 37 (1997) 171-179.
- Radosevich, M., Traina, S.J., Hao, Y.L. and Tuovinen, O.H.: Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 297-302.
- Raillard, S., Krebber, A., Chen, Y., Ness, J.E., Bermudez, E., Trinidad, R., Fullem, R., Davis, C., Welch, M., Seffernick, J., Wackett, L.P., Stemmer, W.P.C. and Minshull, J.: Novel enzyme activities and functional plasticity revealed by recombining highly homologous enzymes. *Chemistry & biology* 8 (2001) 891-898.
- Rappé, M. and Giovannoni, S.: The uncultured microbial majority *Annual Review of Microbiology* 57 (2003a) 369-394.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J.: The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57 (2003b) 369-394.
- Raveton, M., Ravanel, P., Serre, A.M., Nurit, F. and Tissut, M.: Kinetics of Uptake and Metabolism of Atrazine in Model Plant Systems. *Pesticide Science* 49 (1997) 157-163.



- Reams, A.B. and Neidle, E.L.: Gene Amplification Involves Site-specific Short Homology-independent Illegitimate Recombination in *Acinetobacter* sp. Strain ADP1. *Journal of Molecular Biology* 338 (2004) 643-656.
- Robert, M. and Juste, C.: Enjeux environnementaux et industriels - Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol. In: Crin, L.C.d.C. (Ed.), *Spéciation des métaux dans le sol*, Paris, 1999, pp. 15-37.
- Romantschuk, M., Richter, G.Y., Mukhopadhyay, P. and Mills, D.: IS801, an insertion sequence element isolated from *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *Molecular Microbiology* 5 (1991) 617-622.
- Rousseaux, S., Hartmann, A. and Soulas, G.: Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology* 36 (2001) 211-222.
- Russell, R.J., Scott, C., Jackson, C.J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M.C., Coppin, C.W., Liu, J.-W. and Oakeshott, J.G.: The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications* 4 (2011) 225-248.
- Sadowsky, M., Tong, Z., Souza, M.D. and Wackett, L.: AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *J Bacteriol* 180 (1998) 152-8.
- Sajjaphan, K., Shapir, N., Wackett, L.P., Palmer, M., Blackmon, B., Tomkins, J. and Sadowsky, M.J.: *Arthrobacter aurescens* TC1 Atrazine Catabolism Genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* Are Linked on a 160-Kilobase Region and Are Functional in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 4402-4407.
- Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M. and Li, L.Y.: Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 579-590.
- Sathiakumar, N., Delzell, E., Amoateng-Adjepong, Y., Larson, R. and Cole, P.: Epidemiologic Evidence on the Relationship between Mists Containing Sulfuric Acid and Respiratory Tract Cancer. *Critical Reviews in Toxicology* 27 (1997) 233-251.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring harbor, N.Y., 1989.
- Sass, J.B. and Colangelo, A.: European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 12 (2006) 260-267.
- Satsuma, K.: Characterisation of new strains of atrazine-degrading *Nocardioide*s sp isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem. *Pest Management Science* 62 (2006) 340-349.
- Saunders, C.W. and Guild, W.R.: Monomer plasmid DNA transforms *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular and General Genetics MGG* 181 (1981) 57-62.
- Schaechter, M., Medoff, G. and Eisenstein, B.I.: *Microbiologie et pathologie infectieuse*. De boeck et Larcier S.A., Paris, Bruxelles, 1999.
- Scott, C., Jackson, C.J., Coppin, C.W., Mourant, R.G., Hilton, M.E., Sutherland, T.D., Russell, R.J. and Oakeshott, J.G.: Catalytic Improvement and Evolution of Atrazine Chlorohydrolase. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 2184-2191.
- Scott, C., Lewis, S.E., Milla, R., Taylor, M.C., Rodgers, A.J.W., Dumsday, G., Brodie, J.E., Oakeshott, J.G. and Russell, R.J.: A free-enzyme catalyst for the bioremediation of environmental atrazine contamination. *Journal of Environmental Management* 91 (2010) 2075-2078.
- Scott, C., Pandey, G., Hartley, C., Jackson, C., Cheesman, M., Taylor, M., Pandey, R., Khurana, J., Teese, M., Coppin, C., Weir, K., Jain, R., Lal, R., Russell, R. and Oakeshott, J.: The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48 (2008) 65-79.



- Scott, J.R., Kirchman, P.A. and Caparon, M.G.: An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (1988) 4809-4813.
- Seffernick, J.L., de Souza, M.L., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Melamine Deaminase and Atrazine Chlorohydrolase: 98 Percent Identical but Functionally Different. *J. Bacteriol.* 183 (2001) 2405-2410.
- Seffernick, J.L., Johnson, G., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Substrate Specificity of Atrazine Chlorohydrolase and Atrazine-Catabolizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4247-4252.
- Seffernick, J.L., McTavish, H., Osborne, J.P., de Souza, M.L., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Atrazine Chlorohydrolase from *Pseudomonas* Sp. Strain ADP Is a Metalloenzyme. *Biochemistry* 41 (2002) 14430-14437.
- Seffernick, J.L., Reynolds, E., Fedorov, A.A., Fedorov, E., Almo, S.C., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: X-ray Structure and Mutational Analysis of the Atrazine Chlorohydrolase TrzN. *Journal of Biological Chemistry* 285 (2010) 30606-30614.
- Seibert, C.M. and Raushel, F.M.: Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily. *Biochemistry* 44 (2005) 6383-6391.
- Seiler, A., Brenneisen, P. and Green, D.H.: Benefits and risks of plant protection products. Possibilities of protecting drinking water: case atrazine. *water supply* 10 (1992) 31-42.
- Shao, Z.Q. and Behki, R.: Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. strain TE1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 2061-2065.
- Shapir, N., Mongodin, E.F., Sadowsky, M.J., Daugherty, S.C., Nelson, K.E. and Wackett, L.P.: Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. *J. Bacteriol.* 189 (2007) 674-682.
- Shapir, N., Osborne, J.P., Johnson, G., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Purification, Substrate Range, and Metal Center of AtzC: the N-Isopropylammelide Aminohydrolase Involved in Bacterial Atrazine Metabolism. *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5376-5384.
- Shapir, N., Rosendahl, C., Johnson, G., Andreina, M., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Substrate Specificity and Colorimetric Assay for Recombinant TrzN Derived from *Arthrobacter aurescens* TC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2005a) 2214-2220.
- Shapir, N., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: Purification and Characterization of Allophanate Hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *J. Bacteriol.* 187 (2005b) 3731-3738.
- Shapiro, J.A.: Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (1979) 1933-1937.
- Shapiro, R. and Klein, R.S.: The Deamination of Cytidine and Cytosine by Acidic Buffer Solutions. *Mutagenic Implications. Biochemistry* 5 (1966) 2358-2362.
- Shim, H. and Raushel, F.M.: Self-Assembly of the Binuclear Metal Center of Phosphotriesterase. *Biochemistry* 39 (2000) 7357-7364.
- Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., Gierl, A. and Kwang, W.J.: Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants, *International Review of Cytology. Academic Press, 2000*, pp. 319-346.
- Siguier, P., Filée, J. and Chandler, M.: Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology* 9 (2006a) 526-531.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J. and Chandler, M.: ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research* 1 (2006b) D32-D36.
- Singh, P., Suri, C.R. and Cameotra, S.S.: Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317 (2004) 697-702.



- Smith, D. and Crowley, D.E.: Contribution of ethylamine degrading bacteria to atrazine degradation in soils. *FEMS Microbiology Ecology* 58 (2006) 271-277.
- Solomon, J.M. and Grossman, A.D.: Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics* 12 (1996) 150-155.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W. and Williams, W.M.: Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (1996) 31-76.
- Soulas, G.: Evidence for the Existence of Different Physiological Groups in the Microbial Community Responsible for 2,4-D Mineralization in Soil. *Soil Biology & Biochemistry* 25 (1993) 443-449.
- Soulas, G. and Lagacherie, B.: Modelling of microbial degradation of pesticides in soils. *Biology and Fertility of Soils* 33 (2001) 551-557.
- Soutter, M. and Musy, A.: *Physique du sol*, PPUR ed, 1991.
- Sparling, P.F.: Genetic Transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to Streptomycin Resistance. *J. Bacteriol.* 92 (1966) 1364-1371.
- Sposito, G.: *The Chemistry of Soils*, 2nd Edition ed, 2008.
- Springael, D. and Top, E.M.: Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology* 12 (2004) 53-58.
- Stamper, D.M., Radosevich, M., Hallberg, K.B., Traina, S.J. and Tuovinen, O.H.: *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. *Canadian Journal of Microbiology* 48 (2002) 1089-1098.
- Stengel, P. and Gelin, S.: *Sol : interface fragile*, 1998.
- Stipičević, S., Fingler, S. and Drevenkar, V.: Effect of Organic and Mineral Soil Fractions on Sorption Behaviour of Chlorophenol and Triazine Micropollutants. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 60 (2009) 43-52.
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E. and Inouye, M.: Frameshift Mutations and the Genetic Code. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 31 (1966) 77-84.
- Strong, L.C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P.: *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) 5973-5980.
- Struthers, J.K., Jayachandran, K. and Moorman, T.B.: Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 64 (1998) 3368-75.
- Swift, M.J., Izac, A.M.N. and van Noordwijk, M.: Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes : are we asking the right questions? *Agriculture, Ecosystems, Environment* 104 (2004) 113-134.
- Swindell, S.R. and Plasterer, T.N.: SEQMAN. Contig assembly. *Methods Mol Biol* 70 (1997) 75-89.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (1994) 4673-4380.
- Timmerman, K.P. and Tu, C.-P.D.: Complete sequence of IS3. *Nucleic Acids Research* 13 (1985) 2127-2139.
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Grossel, H., James, A. and Marchand, M.: Les substances prioritaires de la Directive cadre sur l'eau (DCE)-Fiches de synthèse., Rapport IFREMER (2005).
- Tissut, M., Delval, P., Mamarot, J. and Ravanel, P.: *Plantes, herbicides et desherbage*. ACTA, Paris, 2006.



- Topp, E., Mulbry, W.M., Zhu, H., Nour, S.M. and Cuppels, D.: Characterization of S-Triazine Herbicide Metabolism by a *Nocardioide* sp. Isolated from Agricultural Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000a) 3134-3141.
- Topp, E., Zhu, H., Nour, S.M., Houot, S., Lewis, M. and Cuppels, D.: Characterization of an Atrazine-Degrading *Pseudaminobacter* sp. Isolated from Canadian and French Agricultural Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000b) 2773-2782.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. and Daae, F.L.: High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 782-787.
- Udiković-Kolić, N., Devers-Lamrani, M., Petrić, I., Hršak, D. and Martin-Laurent, F.: Evidence for taxonomic and functional drift of an atrazine-degrading culture in response to high atrazine input. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (2011) 1547-1554.
- Udiković-Kolić, N., Hršak, D., Devers, M., Klepac-Ceraj, V., Petrić, I. and Martin-Laurent, F.: Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. *Journal of Applied Microbiology* 109 (2010) 355-367.
- Udiković Kolić, N., Martin-Laurent, F., Devers, M., Petrić, I., Begonja Kolar, A. and Hršak, D.: Genetic potential, diversity and activity of an atrazine-degrading community enriched from a herbicide factory effluent. *Journal of Applied Microbiology* 105 (2008) 1334-1343.
- Vaishampayan, P.A., Kanekar, P.P. and Dhakephalkar, P.K.: Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60 (2007) 273-278.
- Vallaey, T., Courde, L., Mc Gowan, C., Wright, A.D. and Fulthorpe, R.R.: Phylogenetic analyses indicate independent recruitment of diverse gene cassettes during assemblage of the 2,4-D catabolic pathway. *FEMS Microbiology Ecology* 28 (1999) 373-382.
- Van der Meer, J.R. and Sentchilo, V.: Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003) 248-254.
- Vargha, M., Takáts, Z. and Márialigeti, K.: Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. *Water Research* 39 (2005) 1560-1568.
- Venema, G. and Morris, A.H.R.a.J.G.: *Bacterial Transformation, Advances in Microbial Physiology.* Academic Press, 1979, pp. 245-331.
- Verschueren, K.H.G., Seljee, F., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H. and Dijkstra, B.W.: Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* 363 (1993) 693-698.
- Wackett, L.P.: Evolution of Enzymes for the Metabolism of New Chemical Inputs into the Environment. *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 41259-41262.
- Wackett, L.P., Sadowsky, M.J., Martinez, B. and Shapir, N.: Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology & Biotechnology* 58 (2002) 39-45.
- Watson, J.D. and Hayes, W.: Genetic Exchange in *Escherichia Coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 39 (1953) 416-426.
- Weber, J.B., Warren, R.L., Swain, L.R. and Yelverton, F.H.: Physicochemical property effects of three herbicides and three soils on herbicide mobility in field lysimeters. *Crop Protection* 26 (2007) 299-311.
- Weber, J.B., Weed, S.B. and Ward, T.M.: Adsorption of s-triazines by soil organic matter *Weed Science* 17 (1969) 417-421
- Werck-Reichhart, D.I., Hehn, A. and Didierjean, L.: Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science* 5 (2000) 116-123.
- Weston, D.P. and Jackson, C.J.: Use of Engineered Enzymes to Identify Organophosphate and Pyrethroid-Related Toxicity in Toxicity Identification Evaluations. *Environmental Science & Technology* 43 (2009) 5514-5520.



- Wheatcroft, R., McRae, D.G. and Miller, R.W.: Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3 (1990) 9-17.
- Whittle, G., Shoemaker, N.B. and Salyers, A.A.: The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (2002) 2044-2054.
- Widmer, S.K. and Spalding, R.F.: A natural gradient transport study of selected herbicides. *Journal of Environmental Quality* 24 (1995) 445-453.
- Winkelman, D.A. and Klaine, S.J.: Degradation and bound residue formation of atrazine in a western Tennessee soil. *Environmental Toxicology & Chemistry* 10 (1991) 335-345.
- Wiseman, H. and Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313 (1996) 17-29.
- Yassir, A., Lagacherie, B., Houot, S. and Soulas, G.: Microbial aspects of atrazine biodegradation in relation to history of soil treatment. *Pesticide Science* 55 (1999) 799-809.
- Zablotowicz, R.M., Krutz, L.J., Reddy, K.N., Weaver, M.A., Koger, C.H. and Locke, M.A.: Rapid development of enhanced atrazine degradation in a dundee silt loam soil under continuous corn and in rotation with cotton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 852-859.
- Zablotowicz, R.M., Weaver, M.A. and Locke, M.A.: Microbial adaptation for accelerated atrazine mineralization/ degradation in Mississippi Delta soils. *Weed Science* 54 (2006) 538-547.
- Zamyatnin, A.A.: Protein volume in solution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 24 (1972) 107-123.
- Zawadzki, P., Roberts, M.S. and Cohan, F.M.: The Log-Linear Relationship Between Sexual Isolation and Sequence Divergence in *Bacillus* Transformation is Robust. *Genetics* 140 (1995) 917-932.
- Zinser, E.R., Schneider, D., Blot, M. and Kolter, R.: Bacterial Evolution Through the Selective Loss of Beneficial Genes: Trade-Offs in Expression Involving Two Loci. *Genetics* 164 (2003) 1271-1277.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Van 't Riet, K.: Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1875-1881.



# **ANNEXES**



## ANNEXE I : Composition des milieux de culture

### Traitement au préalable et a posteriori

- La verrerie a été préalablement autoclavée selon le cycle : 20 min à 120 °C.
- Une fois le milieu préparé il a été également autoclavé dans de la verrerie obstruée par un bouchon.
- En raison du caractère thermolabile de certaines molécules celles-ci sont rajouté en sortie d'autoclave une fois la température stabilisée autour de 50 °C (température non dénaturante et permettant de maintenir l'agar en fusion).
- Les milieux solides en boite de Petri ainsi que les milieux liquides sont conservé à 4 °C.
- Les solutions mères d'acide borique,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NaMo}$  et  $\text{ZnSO}_4$  et de vitamines (biotine et thiamine) sont concentrées au 1000<sup>ième</sup> afin de diminuer le volume des aliquotes.
- Avant l'autoclavage le pH de la solution est ajusté à 6,6

#### 1) Le milieu minéral MS

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,4 g L <sup>-1</sup>
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,6 g L <sup>-1</sup>
$\text{CaCl}_2$	0,02 g L <sup>-1</sup>
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g L <sup>-1</sup>
$\text{ZnSO}_4$	0,2 mg L <sup>-1</sup>
Biotine	0,1 g L <sup>-1</sup>
Thiamine-HCL	0,04 g L <sup>-1</sup>
Citrate	1 g L <sup>-1</sup>

#### 2) Le milieu Luria Bertani

Bactotryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	170 mM
H <sub>2</sub> O qsp	1 L
Pour la préparation de milieu solide, 15 g d' agar sont ajoutés.	

#### Ajout d'atrazine ou d'acide cyanurique afin d'obtenir un milieu MSA ou MSAC

L'atrazine est, après pesée, mélangée à du méthanol (solvant permettant sa solubilisation). Ce mélange a été ajouté au milieu (MSA) à raison d'1 mL.L<sup>-1</sup>. La concentration finale en atrazine sera de 30 mg.L<sup>-1</sup> pour le milieu liquide et de 500 mg.L<sup>-1</sup> pour le milieu solide.

L'acide cyanurique est ajouté dans le milieu (MSAC) directement à des concentrations variant entre 0,1 à 1 g.L<sup>-1</sup> puis l'ensemble est placé dans un sonicateur jusqu'à dissolution complète de la molécule.

#### 3) Le milieu SOC

Bactotryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 mM
Glucose	20 mM
KCl	2,5 mM
$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	10 mM
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	10 mM
H <sub>2</sub> O qsp	1L

#### 4) Le milieu TY

Bactotryptone	5 g
Extrait de levure	3 g
$\text{CaCl}_2$ (60 mM)	10 mL
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L
Pour la préparation de milieu solide, 15 g d' agar sont ajoutés.	

#### 4) Le tampon Knapp

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g.L <sup>-1</sup>
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g.L <sup>-1</sup>
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g.L <sup>-1</sup>
$\text{FeCl}_3$	0,004g.L <sup>-1</sup>



## ANNEXE II : Les amorces utilisées lors de cette thèse

Gène ciblé	Nom	Séquence nucléotidique (5'>3')	Température de fusion	Reference
<i>atzA</i>	A1F	ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC	60	De Souza <i>et al.</i> ,1998
	A1r	CAC CCA CCTCAC CAT AGA CC		De Souza <i>et al.</i> ,1998
<i>atzB</i>	B1 r	CACCACTGTGCTGTGGTAGA	60	Devers <i>et al.</i> ,2004
	B1f	AGGGTGTGGGGGGAAC		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzC</i>	Cf	GCTCAGATGCAGGTACTCCA	57	De Souza <i>et al.</i> ,1998
	Cr	Cr TCCCCAACTAAATCACAGC		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzD</i>	Df	TCCCACCTGACATCACAAC	60	Devers <i>et al.</i> ,2004
	Dr	GGGTCTCGAGGTTTGATTG		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzE</i>	Ef	GAGCCTCTGTCCGTAGATCG	60	Devers <i>et al.</i> ,2004
	Er	GATGGCGTGTACCGTTTACC		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzF</i>	Ff	ACCAGCCCTTGAATCATCAG	57	Devers <i>et al.</i> ,2004
	Fr	TATTGTCCCGATACCCAACG		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzD</i>	AtzD-f	ATGTATCACATCGACGTTTT	50	Devers <i>et al.</i> ,2004
	AtzD-r	CAGTCATTGCCGCGCCTTAA		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzE</i>	AtzE-f	ATGAAGACAGTAGAAAATTAT	50	Devers <i>et al.</i> ,2004
	AtzE-r	TCGCCGACTGAAATGTTAA		Devers <i>et al.</i> ,2004
<i>atzF</i>	AtzF-f	ATGAATGACCGCGCCCA	55	Devers <i>et al.</i> ,2004
	AtzF-r	CATACCTCGCGGCTCAATAG		Devers <i>et al.</i> ,2004
<b>pADP1</b>	26932-f	AGTGGGGTGAAGATCGTCTG	60	Cette étude
	Trbn-r	GTCGCCCTTGTGCTTGC		Cette étude
<b>RNA polymerase promoter</b>	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	58	Cette étude
	SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG		Cette étude
<i>trzN</i>	C190-10	CACCAGCACCTGTACGAGG	57	Mulbry <i>et al.</i> , 2002
	C190-11	GATTGGAACCATTCCAACG		Mulbry <i>et al.</i> , 2002
<b>M13 (topo)</b>	M13REV	AACAGCTATGACCATG	60	Cette étude
	M13	GTAAAACGACGGCCAGT		Cette étude
<b>ARNr16s</b>	ARNr16sf	CTGGTAGTCCACGCCGTA	58	Gurtler et Stanisich, 1996
	ARNr16sr	CGAATTAACCACATGCTCCAC		57
<i>TrzD</i>	TrzDf1	CCTCGCGTTCAAGGTCTACT	60	Rousseaux <i>et al.</i> , 2001
	TrzDr1	TCGAAGCGATAACTGCATTG		60
<i>AtzA</i>	AtzAR_FC	ATGCAAACGCTCAGCATCCAG	62	Cette étude
	AtzAF_FC	CTAGAGGCTGCGCAAGCTGG	63	Cette étude
<b>EatzA</b>	<i>EatzA-F</i>	<b>AACCAAACACATATGCAAACGCTCAGCATCCAGCACGG-TACCCTCGTCACGATGGATCAGTACCGCAGAG</b>		Rousseaux <i>et al.</i> , 2001
	<i>EatzA-R</i>	<b>TGTATT AITGGATCCT AGAGGCTGCGCCAAGCTGGGTTA-GCCACCATGTTCGCCCGC</b>		Rousseaux <i>et al.</i> , 2001 Cette étude



# ANNEXE III : 5th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and the 11th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Marseille (France), October, 22nd-25th 2008.

## SHORT COMMUNICATION

### Evolution of genetic degradation potential of pesticide-degrading bacterial communities

Frédérique Changey, Marion Devers and Fabrice Martin-Laurent

UMR INRA CMSE -Université de Bourgogne, « Microbiologie du Sol et de l'Environnement » 17, rue Sully 21065 Dijon Cedex.

Equipe : Ecologie Microbienne pour la Gestion des Intrants Chimiques et organiques

Corresponding author: fabrice.martin@dijon.inra.fr

#### Abstract

Several bacterial isolates are known to metabolize herbicides belonging to s-triazines family among which the herbicide atrazine known to world widely contaminate soil and water resources. The initial hydrolytic dechlorination of atrazine to hydroxyatrazine [2-(N-ethylamino)- 4-hydroxy-6-(N-isopropylamino)-1,3,5-triazine] is catalyzed by either *AtzA* or *TrzN*. These two enzymes belong to the amidohydrolase superfamily and shared only weak homologies (e.g. *TrzN* from *Arthrobacter aurescens* TC1 shows 26% amino acid sequence identity to *AtzA* from *Pseudomonas* sp. strain ADP). Although *atzA* was the first gene described, *trzN* seems nowadays to be ubiquitous in atrazine-degrading microorganisms isolated from geographically different areas. The dechlorination of atrazine is an illustration of functional redundancy where two divergent genes code for two enzymes sharing only low identities but catalyzing similar reactions.

In this context, the aim our study is to study the competition between *TrzN* and *AtzA* from an ecological and a biochemical point of view using a molecular-based approach. To do so, the upper atrazine-degrading pathway (either *trzN*, *atzBC* or *atzABC*) transforming atrazine to cyanuric acid, was built *in vitro* by a PCR-based approach. Each construction was then subcloned in a surexpression vector and used for transforming *E. coli* competent cells. The ability of either *trzN*, *atzBC* or *atzABC* genetically modified bacterial strains to degrade atrazine and other s-triazines (simazine, terbuthylazine, atraton,...) were assessed. In addition, a competition experiment was performed to estimate the performance of each pathway. This ecological approach was completed by a biochemical data set aiming at describing the specific activity of each constructed pathways.

**Key words:** atrazine, biodegradation, catabolic pathways, *trzN*.

#### Introduction

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is an herbicide inhibiting the photosystem II of plant widely used to control a variety of broadleaf weeds mainly in maize crop. Although this herbicide is nowadays forbidden in Europe, it is still used in North-America and in particular in USA where over 64 million acres of cropland were treated with this low cost herbicide in year 1997[fig1].

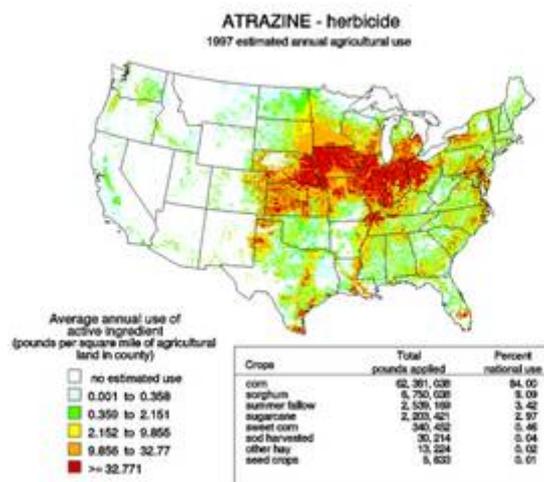


Fig 1: Estimated annual atrazine use in 1997 in USA (US Geological Service)

This compound and its main metabolites are often detected in soil and in surface and ground water where the concentration often exceeds the European Union standard of  $0.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Atrazine was shown to be toxic to humans and other animals, being recognized responsible for mutagenetic, teratogenetic and reproductive effects. The primary mechanisms responsible for the

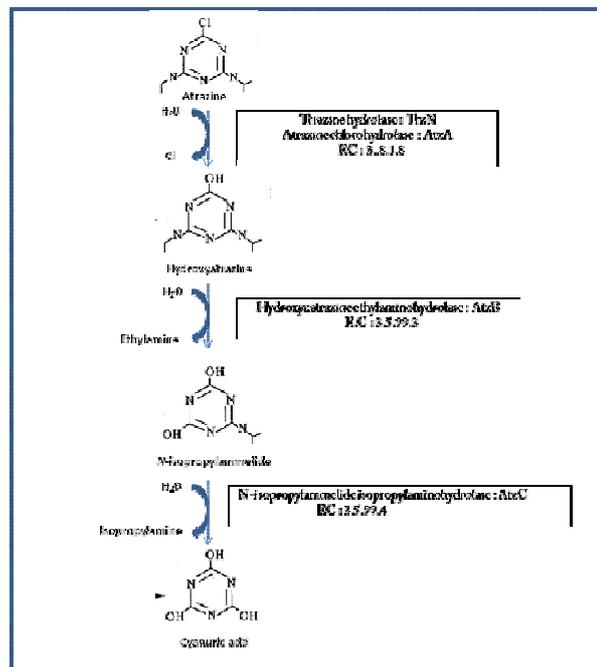


dissipation of atrazine from the environment are biotic including both co-metabolism and metabolism processes (Radosevich *et al.*, 1994)

Indeed, numerous bacterial strains able to entirely metabolize atrazine to simple compounds (CO<sub>2</sub> and biomass) and use it as their sole source of nitrogen for growth have been isolated and characterized. These bacteria isolated from different regions at the scale of the planet (Fig.2), differ phylogenetically but share similar atrazine-degrading genes belonging either to the *atz* or *trz* pathway so [fig 2].



**Fig 2: Localization of the countries from which atrazine-mineralizing bacterial strains have been isolated.** The transformation of atrazine to cyanuric acid is catalysed by three different enzymes belonging to amidohydrolyase superfamily [Fig 3].



**Fig 3: Upper Atrazine catabolic pathway**

The first three steps of the atrazine pathway are catalyzed by atrazine chlorohydrolyase (AtzA), hydroxyatrazine ethylaminohydrolyase (AtzB), and N-isopropylammelide N-isopropylaminohydrolyase (AtzC). The first step of atrazine transformation to hydroxyatrazine may also be catalyzed by TrzN, which like AtzA is responsible for atrazine dehalogenation but show a broader substrate range. Although AtzA and TrzN catalyse similar reaction, they only shared low amino-acid identities. The *trz* and *atz* pathways have been shown to co-exist in different soil, atrazine-degrading consortium and more recently in atrazine-mineralizing bacterial isolate. The co-existence of these two different pathways responsible for identical transformation is a nice example of functional redundancy. It is noteworthy that although *atzA* was the first atrazine-degrading gene described, *trzN* seems nowadays to be ubiquitous in atrazine-degrading microorganisms. To explain the gain of TrzN over AtzA one could hypothesize that the broader range substrate of *trzN*

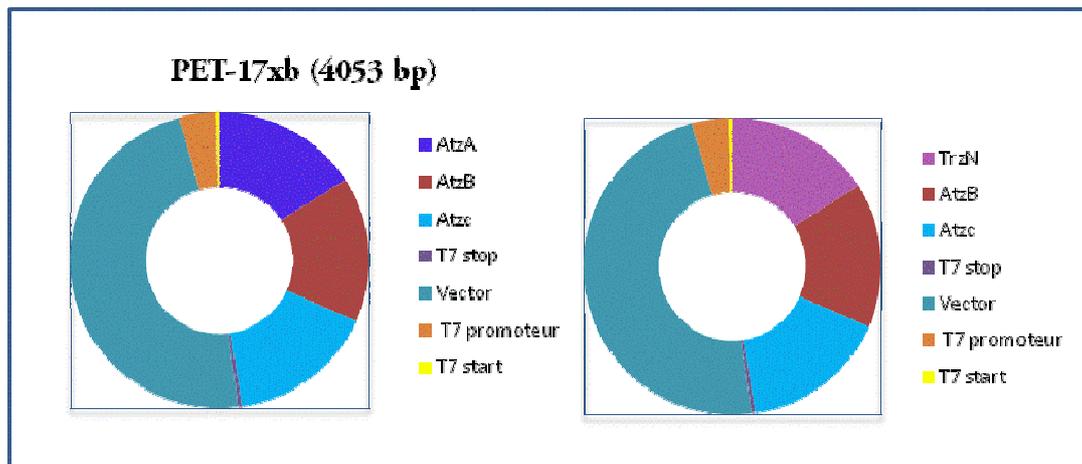


would favor its better maintenance in the soil in absence or low amount of atrazine or alternatively, that this enzyme presents a higher specific activity increasing its fitness thereby favoring its dispersion in the soil environment. The aim of this study is to test the latest hypothesis in order to study the adaptation mechanisms responsible for the genetic evolution of atrazine-degrading communities in soil.

### Experimental section

*atzA*, *atzB*, *atzc* and *trzN* sequences were synthesized by PCR using primers pairs designed for this study and as template DNA extracted from *Pseudomonas* sp. ADP (U66917) for *atz* genes and *Sinorhizobium* sp. NEA-B for *trzN*. Then, PCR fragments were cloned in TOPO TA cloning vector and subcloned in pET surexpression vector. Each pET-degradative gene construction will permit to product native protein in order to determine its specific activity.

A third construction will be performed to form a synthetic operon (either *atzABC* or *trzN*, *atzBC*) responsible for the transformation of atrazine to cyanuric acid (Fig. 4). Inserts will be amplified by PCR and entirely sequence to check for the construction.



**Fig 4 : Construction included *AtzA* or *TrzN* in surexpression vector pET17xb**

Verified recombinant vectors will then be used to transform competent *E. coli* cells. Screening for recombinant clones will be performed using a PCR approach. Selected clones will be cultivated to overexpress each enzyme or combination of enzymes in *E. coli*. Transformation activity will be checked by HPLC measurement. Specific activity of each enzyme or combination of enzymes will be determined. Endly, a competition experiment will be performed in order to test for our working hypothesis aiming at determining the optimal gene combination for transforming atrazine to cyanuric acid.

### References :

- [1] Boundy-Mills, K., M. L. de Souza, R. M. Mandelbaum, L. P. Wackett, and M. J. Sadowsky. 1997. The *AtzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:916-923.
- [2] De Souza ML, Sadowsky MJ & Wackett LP .1996. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification and protein characterization. *J Bacteriol* 178: 4894-4900.
- [3] Radosevich, M., S. J. Traina, et al.1995. "Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate." *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1): 297-302.
- [4] Sadowsky MJ, Tong Z, De Souza ML & Wackett LP .1998. AtzC is a new member of the aminohydrolase protein super family and is homologous to other atrazine-metabolizing enzyme. *J Bacteriol* 180: 152-158.
- [5] Seffernick, J. L., H. McTavish, J. P. Osborne, M. L. de Souza, M. J. Sadowsky, and L. P. Wackett. 2002. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP is a metalloenzyme. *Biochemistry* 41:14430-14437.
- [6] Seffernick, J. L., and L. P. Wackett. 2001. Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry* 40:12747-12753.
- [7] Topp, E., W. Mulbry, H. Zhu, S. M. Nour, and D. Cuppels. 2000. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3134-3141.



# ANNEXE IV : 6th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and the 12th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Matera (Italy), September, 7<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>, 2010.

## SHORT COMMUNICATION

Genetic plasticity of atrazine-degrader: Evidence for the deletion of *atzABC* genes in *Pseudomonas* sp. ADP in response to cyanuric acid selection pressure.

Frédérique CHANGEY, Marion DEVERS-LAMRANI, Nadine ROUARD and Fabrice MARTIN-LAURENT

INRA, Université de Bourgogne, Microbiologie du Sol et de l'Environnement, 17 rue Sully 21065 Dijon Cedex.

### SUMMARY

Several bacterial strains are known to metabolize s-triazines herbicides among which atrazine reported worldwide to contaminate soil and water resources. The complete mineralization of atrazine to carbon dioxide and ammonium is catalyzed by 6 hydrolytic enzymes encoded by *atzABCDEF* genes located on the plasmid pADP1 in *Pseudomonas* ADP. The *atzABC* genes code for the upper pathway transforming atrazine to cyanuric acid, while the *atzDEF* genes code for the lower pathway transforming cyanuric acid to simple compounds. In order to study the genetic plasticity of the atrazine catabolic pathway, we performed an *in vitro* evolution study consisting in applying a continuous selection pressure with cyanuric acid as sole nitrogen source on *Pseudomonas* sp. After *in vitro* evolution the cyanuric acid degradation potential using HPLC analysis, of the native and of the newly-evolved *Pseudomonas* sp. population was assessed. Characterization of genetic potential revealed that the *atzABC* sequences were deleted in the newly-evolved population, probably by homologous recombination mediated by IS sequences. As a consequence, this *in vitro* evolution experiment suggests that the selection pressure exerted by the cyanuric acid led to the selection of a population showing a better fitness towards this metabolite, due to the loss of a genetic overload.

**Key words:** *in vitro* evolution, selection pressure, Cyanuric acid,, genetic plasticity, *Pseudomonas* pADP.

### INTRODUCTION

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is an herbicide (photosystem II inhibitor) belonging to the s-triazine family widely used to control various broadleaf weeds mainly in corn crop. Over 64 million acres of cropland were treated with atrazine in the U.S. in 1997 [Fig 1].

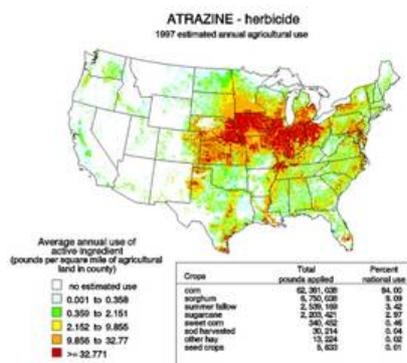


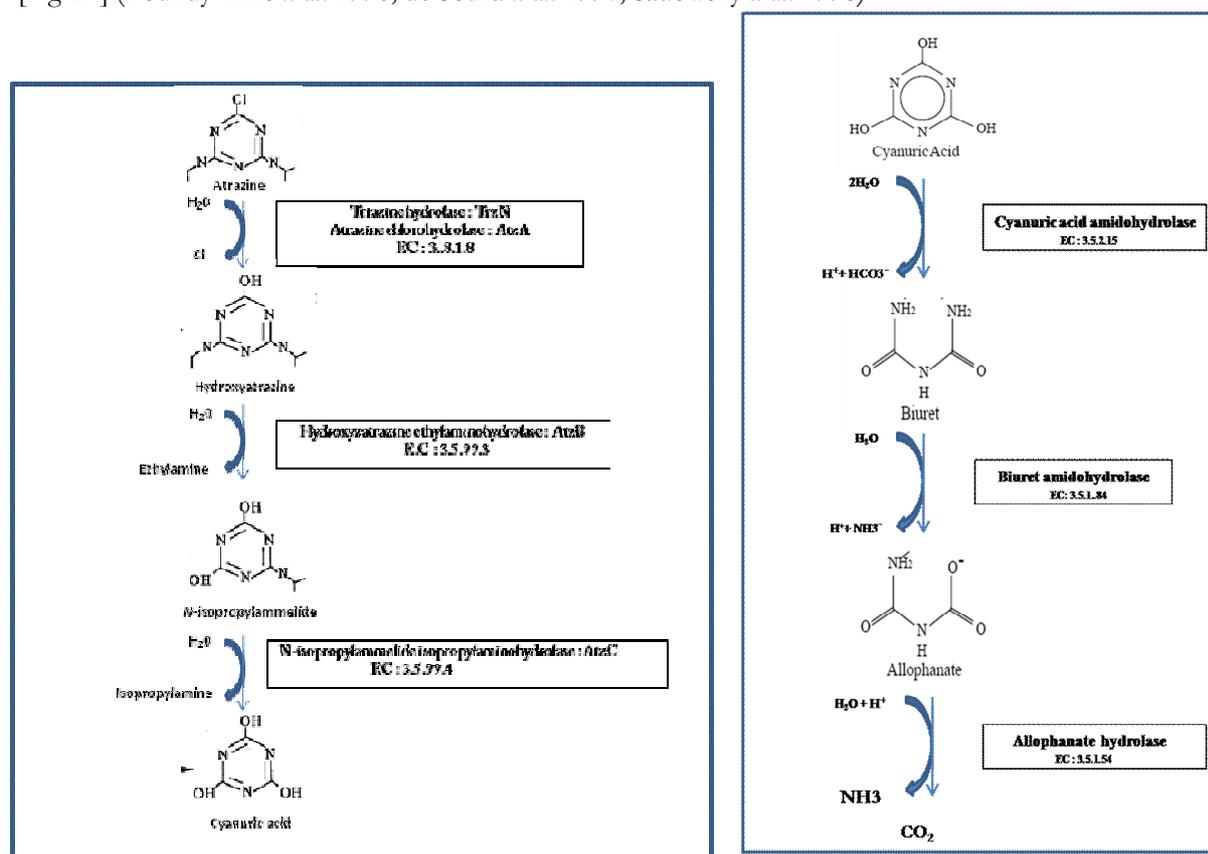
Fig 1: Estimated annual atrazine use in 1997 in USA (US Geological Service)



Atrazine as well as its known main metabolites (DEA and DIA) are often detected in soil and water resources at concentrations often exceeding the European Union standard of  $0.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Atrazine is slightly toxic to humans and other animals, due to its mutagenetic, teratogenic and reproductive effects. The primary mechanism for the dissipation of atrazine from the environment is through biological degradation (Radosevich *et al.*, 1994). In addition, it has been shown that repeated treatment of soil with this herbicide lead to the adaptation of the soil microflora to its accelerated biodegradation (Barriuso *et al.*, 1996). Several bacterial consortia and populations able to metabolize and use atrazine as sole source of nitrogen for their growth have been isolated and characterized (Mandelbaum *et al.* 1995; Topp *et al.* 2000; Rousseaux *et al.* 2001; Piutti *et al.* 2004; Devers *et al.* 2008).

*Pseudomonas* sp. ADP one of the atrazine-degrading strain, is often used as a model since atrazine-degrading catabolic pathway has been entirely described. This pathway proceeds through six hydrolytic reactions catalysed by different enzymes encoded by *atzABCDEF* genes located on pADP1 a conjugative plasmid of 108,845-nucleotides.

The upper pathway transforms atrazine to cyanuric acid (1,3,5-triazine-2,4,6-triol). It consisted in the sequential hydrolytic removal of *s*-triazine ring substituent, is catalyzed by the atrazine chlorohydrolase (AtzA), hydroxyatrazine ethylaminohydrolase (AtzB), and N-isopropylammelide N-isopropylaminohydrolase (AtzC) [Fig 2A] (Boundy-Mills *et al.* 1996; de Souza *et al.* 1997; Sadowsky *et al.* 1998).



**Fig 2.** Panel A: Upper atrazine-degradation pathway transforming atrazine to cyanuric acid. Panel B: Lower atrazine-degradation pathway transforming cyanuric acid to CO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub>.

The lower pathway transforms cyanuric acid to CO<sub>2</sub>. via hydrolytic *s*-triazine ring opening of cyanuric acid [Fig 2B] (Martinez *et al.* 2001). This transformation is performed by three hydrolases encoded by *atzDEF* genes located contiguously on pADP1 organized as an operon placed under the regulation of *atzR*, a transcriptional factor belonging to the LysR family (Garcia-Gonzales *et al.*).

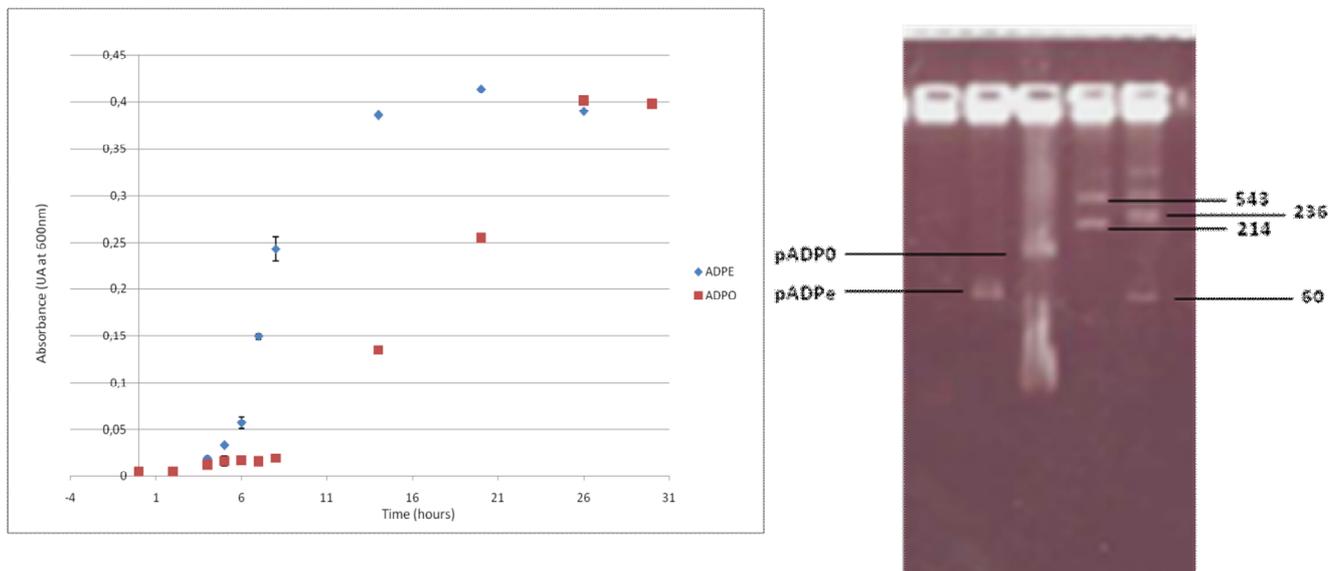
The aim of our study was to estimate the genetic plasticity of an atrazine-degrading population placed under a selection pressure exerted by the substrate in order to mimic the influence of the environment changes on



atrazine availability. To do so an *in vitro* evolution experiment consisting in sub-cultivating *Pseudomonas* sp. ADP on mineral salt medium added with cyanuric acid as sole source of carbon was settled down. The impact of *in vitro* evolution, was assessed on the newly-evolved population by comparison to the original one

## EXPERIMENTAL DESIGN

Subculture of *Pseudomonas* sp. ADP was carried out in mineral liquid medium containing cyanuric acid as sole source of nitrogen for approx. 120 generations. The performances of the native *Pseudomonas* sp. ADP population (ADPO) and of the newly-evolved population (ADPE) were estimated by determining their growth kinetics on cyanuric acid and by measuring their ability to degrade this intermediary metabolite of atrazine. Possible genetic modifications in the atrazine-degrading were addressed by plasmid profiling, southern blot analyses, long PCR and sequencing.



**Fig 3: Panel A:** Growth curve of the native (ADPO) and of the newly-evolved *Pseudomonas* sp. ADP population (ADPE). **Panel B:** Plasmid profile (size in bp) of the native (ADPO) and of the newly-evolved *Pseudomonas* sp. ADP population (ADPE).

## RESULTS

The analysis of growth performances revealed that the newly evolved population grew much faster than the native *Pseudomonas* sp. ADP population [Fig. 3]. The characterization of atrazine-degrading genetic potential revealed that the size of pADP1 decreased in ADPE as compared to ADPO [Fig. 4]. Southern blot analysis further indicates a deletion of a 50Kpb fragment containing *atzABC* genes in ADPE. Long PCR surrounding the deletion was performed to determine precisely the molecular processes leading to the deletion of this large portion of ADP1 and homologous recombination mediated by IS sequences is suspected.

## CONCLUSION

The selection pressure exerted by cyanuric acid led to the adaptation of *Pseudomonas* sp. ADP population which eliminates *atzABC* genes which are constitutively expressed and as a consequence represented a genetic



overload under this condition. This in vitro evolution experiment demonstrates that IS sequences could also be involved in the loss of functional genes and that decrease in the genetic overload may increase the fitness of newly evolved population at least under the conditions tested here. This work opens interesting insight in the concept of ecological insurance relying on functional redundancy.

References :

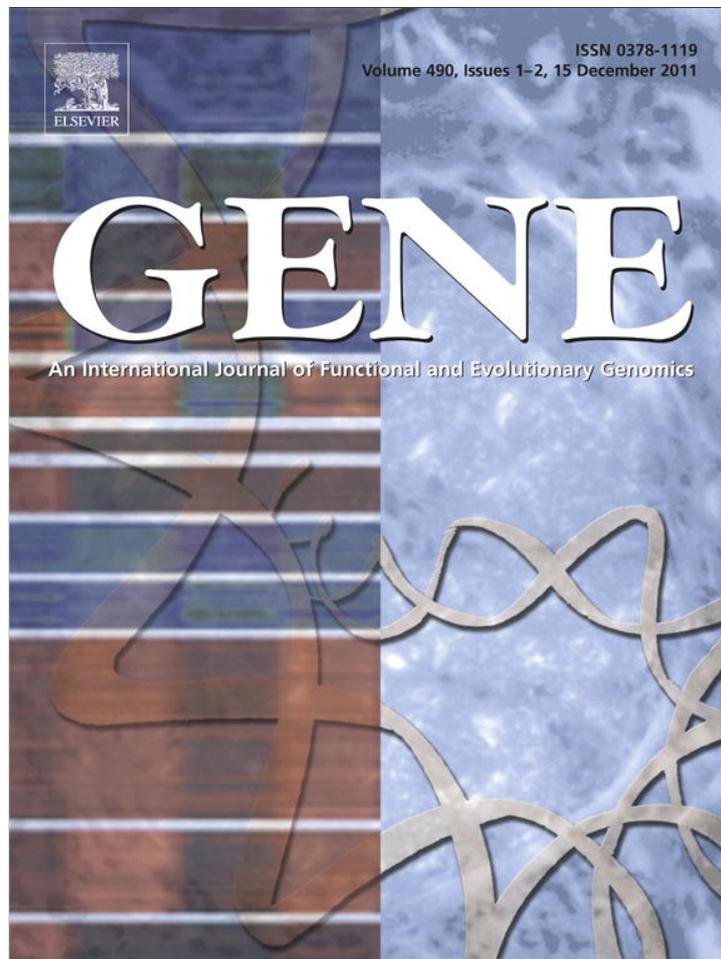
- [1] Boundy-Mills, K., M. L. de Souza, R. M. Mandelbaum, L. P. Wackett, and M. J. Sadowsky. 1997. The *AtzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:916-923.
- [2] De Souza ML, Sadowsky MJ & Wackett LP (1996) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification and protein characterization. *J. Bacteriol.* 178: 4894-4900.
- [3] Garcia-Gonzalez V, Govantes F, Porrua O and E. Santero. 2005. Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J. Bacteriol.* 187: 155–167.
- [4] Martinez B., Tomkins J., Wackett L. P., Wing R. and M. J. Sadowsky 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. ADP. *J. Bacteriol.* 183: 5684–5697
- [5] Piutti S, Semon E, Landry D, Hartmann A, Dousset S, Lichtfouse E, Topp E, Soulas G and F. Martin-Laurent. 2003. Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:111–117.
- [6] Rousseaux S., Hartmann A. and G. Soulas (2001) Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 211–222.
- [7] Sadowsky MJ, Tong Z, De Souza ML and L. P. Wackett. 1998. AtzC is a new member of the aminohydrolase protein super family and is homologous to other atrazine-metabolizing enzyme. *J. Bacteriol.* 180: 152-158.
- [8] Topp, E., W. Mulbry, H. Zhu, S. M. Nour, and D. Cuppels. 2000. Characterization of  $\beta$ -triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3134-3141.



## ANNEXE V : ARTICLE PUBLIES

- I) In vitro evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, B and C genes. *Gene*. 2011 Dec 15; 490(1-2):18-25. Epub 2011 Sep 18.
  
- II) Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Volume 65, Issue 8, December 2011, Pages 1249–1255

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## *In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes

F. Changey, M. Devers-Lamrani, N. Rouard, F. Martin-Laurent\*

INRA, Université de Bourgogne, Microbiologie du Sol et de l'Environnement, 17 rue Sully 21065 Dijon Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 9 September 2011

Available online 18 September 2011

Received by Jean-Marc Deragon

## Keywords:

Experimental evolution

Adaptation

Molecular evolution

Cyanuric acid

Genetic plasticity

*Pseudomonas* sp. ADP

## ABSTRACT

The adaptation of microorganisms to pesticide biodegradation relies on the recruitment of catabolic genes by horizontal gene transfer and homologous recombination mediated by insertion sequences (IS). This environment-friendly function is maintained in the degrading population but it has a cost which could diminish its fitness. The loss of genes in the course of evolution being a major mechanism of ecological specialization, we mimicked evolution *in vitro* by sub-culturing the atrazine-degrading *Pseudomonas* sp. ADP in a liquid medium containing cyanuric acid as the sole source of nitrogen. After 120 generations, a new population evolved, which replaced the original one. This new population grew faster on cyanuric acid but showed a similar cyanuric acid degrading ability. Plasmid profiles and Southern blot analyses revealed the deletion of a 47 kb region from pADP1 containing the *atzABC* genes coding for the enzymes that turn atrazine into cyanuric acid. Long PCR and sequencing analyses revealed that this deletion resulted from a homologous recombination between two direct repeats of a 110-bp, identical to IS*Pps1* of *Pseudomonas huttiensis*, flanking the deleted 47 kb region. The loss of a region containing three functional genes constitutively expressed thereby constituting a genetic burden under cyanuric acid selection pressure was responsible for the gain in fitness of the new population. It highlights the IS-mediated plasticity of the pesticide-degrading potential and shows that IS not only favours the expansion of the degrading genetic potential thanks to dispersion and duplication events but also contribute to its reduction thanks to deletion events.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

In the course of their evolution mainly driven by environmental stresses, bacteria have elaborated a wide range of physiological responses to survive in different ecosystems. They also use a large set of genotypic variations to face environmental changes. Microbial genomes are indeed characterized by a tremendous genetic plasticity (Arber, 1993) which allows them to acquire new genes by horizontal gene transfer (HGT) through different processes on the one hand,

and, to lose preexisting genes by different processes such as mutation or deletion on the other hand. Horizontally acquired genetic material ranges from single genes to complete genomic islets that give additional functionality to their host populations (Lawrence, 1999). Combined with short generation times and large numbers, genetic plasticity offers bacterial populations a tremendous adaptation potential which compensates for the absence of sexual reproduction. Genomic changes, which underlie the evolutionary adaptation of bacterial populations to their environment, are not necessarily beneficial; indeed, several of them may be deleterious and cause cell death. On the contrary, some are favorable, giving a higher fitness to the new population, leading to its selection over the original population, thereby affecting the ecological distribution of bacterial populations (Parnell et al., 2010). However, a specific adaptation leading to the colonization of an ecological niche might be deleterious if environmental conditions happen to change.

The study of bacterial adaptation often deals with new microbial functions which are still in the process of environmental evolution. So far most studies have been carried out about resistance to antibiotics, whose main evolution-driving mechanism is the survival of resistant populations (Mazel and Davies, 1999). Recently we suggested that the adaptation of bacterial populations to pesticide degradation

**Abbreviations:** %, percentage; ADPE, newly evolved *Pseudomonas* sp. ADP population; ADPO, original *Pseudomonas* sp. ADP population; ARDRA, amplified rRNA restriction analysis; AU, arbitrary unit; bp, base pair; C, carbon; °C, Celsius degree; Cm, centimeter; Dig, digoxigenine; DNA, deoxyribonucleic acid; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; g, gram; h, hour; HGT, horizontal gene transfer; HPLC, high performance liquid chromatography; IS, insertion sequence(s); kb, kilobases; LB, luria broth medium; λ, lag time; mL, milliliter; mm, millimeter; MSA, mineral salt atrazine medium; MSCA, mineral salt cyanuric acid medium; nm, nanometer; U, unit; µg, microgram; µL, microliter; µm, micrometer; OD600, optical density at 600 nm; pADP1, plasmid of *Pseudomonas* sp. ADP; PCR, polymerase chain reaction; rpm, rotation per minute; sec, second; TY, tryptone-yeast extract broth medium; Taq, thermophilus aquaticus; v/v, volume per volume.

\* Corresponding author. Fax: +33 3 8069 3224.

E-mail address: [fabrice.martin@dijon.inra.fr](mailto:fabrice.martin@dijon.inra.fr) (F. Martin-Laurent).

could also provide an interesting model (Devers et al., 2008). In this case, the major factor driving bacterial evolution is the formation of a fully functional catabolic pathway enabling pesticide use as a source of C and energy. In this context, we showed that the herbicide atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) used for 50 years on crops such as corn represents an interesting model (Devers et al., 2008). It is not easily degraded and is rather mobile (Belluck et al., 1991) thereby contaminating water resources. As a result of regular exposure to this herbicide, bacterial populations able to degrade and use atrazine as a nitrogen and energy source for their growth have been selected and several of them have been isolated and characterized (Devers et al., 2007a, 2007b; Mandelbaum et al., 1995; Piutti et al., 2003; Rousseaux et al., 2001; Topp et al., 2000). *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995) which harbors the full catabolic pathway made of the *atzA*, *B*, *C*, *D*, *E* and *F* genes located on pADP1, a large self-transmissible plasmid (Martinez et al., 2001), is often used as a model. The early steps of the pathway, made of the *atzA*, *atzB* and *atzC* genes, transform atrazine into cyanuric acid (1,3,5-triazine-2,4,6-triol). These three genes surrounded by IS sequences are detected on different replicons, so they are not yet fixed at a permanent location (Rousseaux et al., 2001). On the contrary, the *atzDEF* genes coding for the enzymes that open the s-triazine ring of cyanuric acid are organized in an operon placed under the regulation of the *atzR* transcription factor (Garcia-Gonzalez et al., 2005). Recently, we showed in an evolutionary experiment conducted on *Pseudomonas* sp. ADP maintained under a selection pressure exerted by atrazine that a newly evolved population showing an increased fitness as compared to the initial population was selected after 320 generations (Devers et al., 2008). Further analyses showed that the gain in fitness of the newly evolved population resulted from a gene dosage effect due to the duplication of the *atzB* gene by homologous recombination mediated by IS sequences. Although the study highlights the plasticity of the atrazine-degrading genetic potential, indicating that the atrazine-catabolic genome may expand as a result of selection pressure, it also questions the maintenance cost of this adaptation in changing environmental conditions. Indeed, several authors suggest that genetic adaptation selected in a given environment might result in a lower fitness toward other environmental conditions (Zinser et al., 2003). Evidence for expansion and reduction of genomes has recently been discovered (Barrick et al., 2009) and adaptive losses of gene activities, leading to an increased fitness under selective conditions have been observed (Furuta et al., 2011; Roth, 2011). In addition, several authors suggest a rapid loss of *atz* genes when atrazine-degrading isolates are cultivated on rich media without any atrazine selection pressure, thereby suggesting a propensity of these strains to eliminate the genes that constitute a genetic burden under unfavorable conditions.

In order to assess the dynamics of the atrazine-degrading genetic plasticity under unfavorable conditions, we investigated the evolution processes of *Pseudomonas* sp. ADP populations placed under cyanuric acid selection pressure. We designed an evolutionary experiment in which *Pseudomonas* sp. ADP harboring the plasmid ADP1 was sub-cultured each week in a liquid mineral salt medium containing cyanuric acid as the sole source of nitrogen. The fitness of the initial and of the final population was assayed and the organization of the atrazine-degrading potential characterized.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strain and media

The strain used in our experiments was *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995). As previously described by Devers et al. (2005), it was maintained on MSA medium containing atrazine (30 mg.l<sup>-1</sup>) as the sole source of nitrogen and citrate (1 g.l<sup>-1</sup>) as a carbon source. *In vitro* evolution was performed with mineral liquid medium containing cyanuric acid (0.5 g.l<sup>-1</sup>) as the sole source of

nitrogen (MSCA) and citrate (1 g.l<sup>-1</sup>) as a carbon source. A rich medium (TY) containing 5 g.l<sup>-1</sup> tryptone, 3 g.l<sup>-1</sup> yeast extract and 10 mM CaCl<sub>2</sub>, was used to determine the growth kinetics of the strains. Knapp buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g.l<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g.l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.04 g.l<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub> 0.004 g.l<sup>-1</sup>) was used for batch experiments aimed at estimating the cyanuric acid degradation ability of the strains. LB medium (10 g.l<sup>-1</sup> tryptone; yeast extract 5 g.l<sup>-1</sup>; and NaCl 10 g.l<sup>-1</sup> containing 100 µg.ml<sup>-1</sup> ampicillin) was used for cloning PCR amplicons.

### 2.2. *In vitro* evolution experiment

*Pseudomonas* sp. strain ADP was grown in MSCA liquid medium at 28 °C on a shaker at 150 rpm. Each week, the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of the culture was estimated by spectrophotometry (Biophotometer, Eppendorf, Germany). An aliquot was collected to perform molecular analyses based on nucleic acid extraction and another one was collected to store the cells at -80 °C in 25% glycerol. An aliquot equivalent to an OD<sub>600</sub> of 0.2 was then inoculated to 200 mL of fresh MSCA medium and incubated under the conditions described above. This procedure was repeated for approximately 120 generations. All along the *in vitro* evolution experiment, the purity of the culture was checked by plating the bacterial cells on solid MSCA medium and performing amplified rRNA restriction analysis (ARDRA) as described previously (Devers et al., 2008).

### 2.3. Growth kinetics

The growth kinetics of the original *Pseudomonas* sp. ADP (ADPO) and newly evolved (ADPE) strains were determined by inoculating an aliquot of the cell culture equivalent to an OD<sub>600</sub> of 0.02 in 100 ml of MSCA or TY medium, in triplicate for each strain and each medium. Cell cultures were incubated at 28 °C on a shaker at 150 rpm. Throughout the 15-hour incubation period, 1 ml aliquots were regularly collected to measure the OD<sub>600</sub> by spectrophotometry. In addition, 1 ml aliquots were regularly collected from cultures grown on MSCA to estimate the amount of cyanuric acid remaining in the culture medium by high performance liquid chromatography (HPLC). Briefly, samples were filtered on 0.2 µm filters, transferred into HPLC vials (32 × 11.6 mm-Cleanpack) and analyzed by an HPLC system (LC Star System®, Varian) equipped with a Microsorb-MV C18 column (length 25 cm, internal diameter 4.6 mm, Varian). The solvent was composed of methanol/ultra pure water (75/25; v/v) delivered at a flow rate of 1 ml.min<sup>-1</sup>. Under these conditions cyanuric acid detected at 225 nm showed a retention time of about 3 min.

To determine the growth parameters of ADPO and ADPE on MSCA medium, the bacterial growth curves were fitted to the modified Gompertz model using SigmaPlot® 6.10 software (Zwietering et al., 1990). The model equation is:  $y = A \cdot \exp\{-\exp[1 + \mu_m \cdot \exp(1) \cdot (\lambda - t)/A]\}$  where  $y$  is the OD<sub>600nm</sub> (AU);  $t$  is the time (h);  $\mu_m$  is the maximum specific growth rate (h<sup>-1</sup>);  $A$  the maximum OD<sub>600nm</sub> value obtained (AU) and  $\lambda$  lag time (h). The parameters were validated by a Student  $t$  test ( $p < 0.005$ ).

As ADPO and ADPE yielded a biphasic growth curve on TY medium, the data could not be fitted into the Gompertz model. As a consequence, their growth rate was estimated by fitting linear regressions on the two phases observed.

To compare the growth parameters of ADPO and ADPE, the kinetic parameters were subjected to a single factor analysis of normality and a Kruskal-Wallis test followed by a Fisher procedure ( $p < 0.01$ ).

### 2.4. Cyanuric acid degradation ability of crude cell extracts

The microbial biomass was produced on MSCA and MSA liquid media for strains ADPE and ADPO, respectively. The cells were harvested by centrifugation at 3,300 g for 5 min. Bacterial pellets were washed twice in Knapp buffer. The cell membrane was then disrupted

using the following procedure. The bacterial cells were transferred into 15-ml falcon® tubes and 2.2 g of 2.2 µm silica beads were added. Bacterial membranes were disrupted at 6 m sec<sup>-1</sup> for 30 sec in a Fast-prep® Instrument (MP Biomedicals, USA). The silica beads were removed by a short centrifugation and cell extracts were recovered in the supernatant. Crude cell extracts were diluted to 0.1 OD<sub>600</sub> in Knapp buffer with cyanuric acid added at 0.5 g l<sup>-1</sup>. Cell suspensions (n = 3 per strain) were incubated at 28 °C under agitation (150 rpm). One milliliter aliquots were regularly collected and analyzed by HPLC as described above to estimate the amount of cyanuric acid remaining in the culture media. These experiments were performed in triplicate and a non-inoculated control was included.

### 2.5. Plasmid profile

One millilitre of bacterial culture adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.2 was centrifuged at 14,000 g for 3 min (Eppendorf-5415R, Germany). Plasmid profiles were obtained from the bacterial pellet using Eckhardt's method as modified by Wheatcroft et al. (1990) (Eckhardt, 1978; Wheatcroft et al., 1990). Plasmid sizes were determined by calibration as compared to the relative mobility of standard plasmids: (i) pAT(543 kb, accession number AE007872) and pTi (214 kb, accession number AE007871) harboured by *Agrobacterium tumefaciens* C58, and (ii) a megaplasmid (41500 kb), pRme41a::Tn7 (236 kb) and pRP4 (60 kb, accession number L27758), harbored by a derivative of *Rhizobium meliloti* 41.

### 2.6. Analysis of the atrazine-degrading genetic potential by PCR

The components of the atrazine-degrading genetic potential of the strains were checked by PCR. *atz A, B, C, D, E* and *F* sequences were amplified using specific primer pairs (for primer sequences see Table 1). PCRs were carried out in a final volume of 25 µl by using 0.2 µM dNTPs, 1 µM of each of the primers and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Q-biogene, France). PCR reactions were carried out in a Personal Mastercycler (Eppendorf, Germany) as follows: 5 min at 95 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at the annealing temperature and 2 min at 72 °C, and an additional 10 min at 72 °C after the last cycle. The PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide (100 µg.l<sup>-1</sup>) (Gibco-BRL, life technologies), and photographed with a CDD camera (Sony, France).

### 2.7. Southern blot analysis

DNA was extracted from 20 ml of ADPO or ADPE bacterial suspension grown on MSA or MSCA medium, respectively, using the Qiagen® Blood and Cell culture DNA Midi Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen®, France).

The DNAs were digested in 40 µl final volume containing 200 ng of DNA and 20U of *NruI* or *SmaI* restriction enzymes (Q-biogene, France). After an overnight incubation at 37 °C, 20 µl of the digested DNA were separated by electrophoresis in an 0.9% agarose gel overnight at 40 V. The digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker II was used as a DNA ladder (Roche Applied Science®, France).

The DNAs in the gels were transferred under vacuum onto a nylon-membrane (Nytran N-0.45 µm nylon blotting membrane-Whatman®). They were then covalently bound to the membrane by 3 min UV exposure and 1 h incubation at 80 °C. They were then hybridized with *ISPps1* and *AtzF* dig-labeled probes. Dig-labeled probes were produced by PCR using specific primer pairs. Hybridization signals were detected under high-stringency conditions as described previously (Devers et al., 2007a, 2007b).

### 2.8. Long PCR

Long PCR was performed using the Expand Long PCR System (Roche Applied Science®, Germany). It was conducted in a final volume of 50 µl containing 500 ng of extracted DNA, 3.75 U of DNA polymerase, 2 mM dNTPs, 0.3 µM 26943 F and *trbNr* primers (for primer sequences see Table 1), 5 µl of buffer and 3 µl of ultra-pure water. DNA amplifications were carried out in a PTC 200 gradient cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) as follows: 2 min at 94 °C, 30 cycles of 10 min at 94 °C, 30 s at 57 °C and 12 min at 68 °C, plus an additional 7 min at 68 °C. The elongation time was increased by 20 s for each cycle from cycle 11 to cycle 30.

A 40 µl aliquot was then immediately purified by adding one volume of cold isopropanol and 2 µl of glycogen and incubating for 1 h at -20 °C. The sample was then centrifuged at 13,500 g at 4 °C for 40 min. The DNA pellet was then washed with cold ethanol 70%, air-dried, and resuspended in 50 µl of ultra-pure water. The purified PCR products were then separated by electrophoresis on 1% agarose gels to control their size and quality.

**Table 1**  
Primers used to perform PCR reactions.

Target sequence	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing temperature	Reference
<i>atzA</i>	A1F	ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC	60	Devers et al. (2004)
	A1r	CAC CCA CCTCAC CAT AGA CC		Devers et al. (2004)
<i>atzB</i>	B1 r	CAC CAC TGT GCT GTG GTA GA	60	Devers et al. (2004)
	B1f	AGG GTG TTG AGG TGG TGA AC		Devers et al. (2004)
<i>atzC</i>	Cf	GCT CAC ATG CAG GTA CTC CA	57	De Souza et al. (1998)
	Cr	TCC CCC AAC TAA ATC ACA GC		Devers et al. (2004)
<i>atzD</i>	Df	TCC CAC CTG ACA TCA CAA AC	60	Devers et al. (2004)
	Dr	GGG TCT CGA GGT TTG ATT G		Devers et al. (2004)
<i>atzE</i>	Ef	GAG CCT CTG TCC GTA GAT CG	60	Devers et al. (2004)
	Er	GAT GGC GTG TAC CGT TTA CC		Devers et al. (2004)
<i>atzF</i>	Ff	ACC AGC CCT TGA ATC ATC AG	57	Devers et al. (2004)
	Fr	TAT TGT CCC GAT ACC CAA CG		Devers et al. (2004)
<i>atzD</i>	AtzD-f	ATG TAT CAC ATC GAC GIT TT	50	This study
	AtzD-r	CAG TCA TTG CCC GCG CIT AA		This study
<i>atzE</i>	AtzE-f	ATG AAG ACA GTA GAA ATT AT	50	This study
	AtzE-r	TCG CCC GAC TGA AAT GTT AA		This study
<i>atzF</i>	AtzF-f	ATG AAT GAC CGC GCG CCC CA	55	This study
	AtzF-r	CAT ACC TCG CGG CTC AAT AG		This study
pADP1	26932-f	AGT GGG GTG AAG ATC GTC TG	60	This study
	Trbn-r	GTC GCC CIT GTC GTT GCG GA		This study
RNA polymerase promoter	T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	58	
	SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG		

### 2.9. Cloning and sequencing of *atzD* and long PCR amplicons

Purified *atzD* and long PCR amplicons were ligated into the pGEMT-EasyII vector and cloned in *Escherichia coli* JM109 according to the manufacturer's recommendations (Promega®, France). Putative white-coloured recombinant clones were checked by PCR using the SP6 and T7 primers as described previously. Confirmed recombinant clones were grown on LB medium containing ampicillin and recombinant plasmids were purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®, France). Cloned *atzD* amplicons were sequenced by Beckman Coulter Genomics®. The resulting sequences were analyzed with Clustal W (Thompson et al., 1994) and Lasergene SeqMan Pro software (DNA Star®). They were deposited in the GenBank database under the following accession numbers: *atzD* Bankit 1458606 and pADP1 E long PCR product Bankit 1458622.

## 3. Results

### 3.1. Evolution of growth and of cyanuric acid degrading capabilities of *Pseudomonas* sp. ADP

The growth parameters of the initial (ADPO) and final (ADPE) bacterial populations obtained after 120 generations of *Pseudomonas* sp. ADP in MSCA medium containing cyanuric acid as the sole nitrogen

source were estimated (Fig. 1, panel A). The growth kinetics presented shows that ADPE grew faster on MSCA than ADPO. The growth parameters presented in Table 2 show statistically significant differences between ADPO and ADPE: the  $\mu_{\max}$  (0.035 h<sup>-1</sup>) of ADPE, the newly evolved population, was higher than that of the initial population (0.024 h<sup>-1</sup>) (n = 3, p < 0.01).

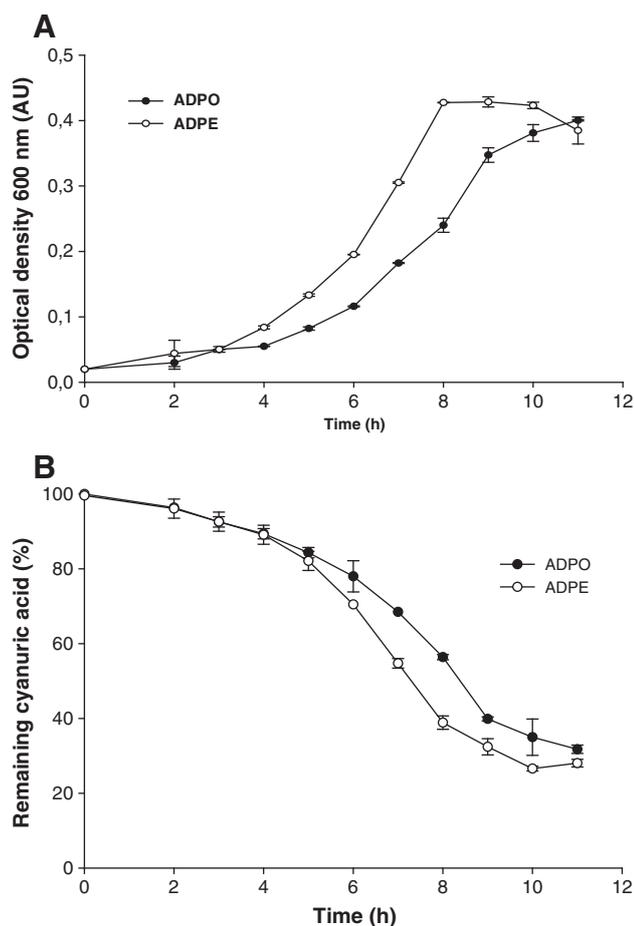
Concomitantly, the ability of ADPO and ADPE populations grown on MSCA to degrade cyanuric acid was estimated by monitoring the amount of cyanuric acid remaining in the culture medium by HPLC (Fig. 1, panel B). In accordance with the growth kinetics shown above, the final population degraded 50% of the cyanuric acid in the MSCA medium within 7.5 h whereas the initial population required 8.7 h. In addition, the rate of cyanuric acid degradation of the ADPE population (13.75 mg.h<sup>-1</sup>) was significantly higher than that of the initial population (8.75 mg.h<sup>-1</sup>) (n = 3, p < 0.01). In order to check if the gain in fitness of ADPE was driven by an increased degrading ability, cyanuric acid degradation by these two populations was monitored in crude cell extracts prepared in Knapp buffer added with cyanuric acid (Fig. 2. Panel A). We showed that the ability of ADPO and ADPE populations was similar in these resting cell experiments, suggesting that the gain in fitness was not directly linked to the degrading ability.

The growth of these two populations was monitored on a rich medium to check if the gain in fitness of the newly evolved population could be due to growth performances. The growth kinetics presented in Fig. 2 (panel B) shows that the two populations had a biphasic growth curve. After a lag phase of four hours, ADPE grew faster than ADPO with significantly different maximum growth rates of 0.14 h<sup>-1</sup> and 0.05 h<sup>-1</sup>, respectively (n = 3, p < 0.01). After eight hours' incubation, the growth curves of ADPO and ADPE showed similar shapes. This observation was further confirmed by the estimation of the growth parameters which were not statistically different (Table 2).

### 3.2. Evidence for DNA rearrangement

The plasmid DNA of the initial and newly evolved *Pseudomonas* sp. ADP populations was analyzed to search for a possible explanation for the gain in fitness observed for the ADPE population selected on MSCA medium during the *in vitro* evolution experiment. The plasmid profiles shown in Fig. 3 (panel A) revealed that the size of plasmid ADP1 which bears the *atzABCDEF* genes averaged 109 kb in ADPO but was reduced to 62 kb in the newly evolved population (i. e. a deletion of approximately 47 kb). In order to check if the atrazine-degrading genetic potential was affected by this deletion, the *atz* gene composition was monitored in ADPO and ADPE by PCR targeting the *atzA*, *B*, *C*, *D*, *E* and *F* genes. ADPO yielded PCR products for all the *atz* genes. By contrast, ADPE yielded only amplicons for *atzD*, *E* and *F*, suggesting the loss of the *atzA*, *B* and *C* genes for this population (data not shown).

In order to describe the deletion, Southern blot analyses were performed with the genomic DNAs extracted from ADPO and ADPE, digested either with *Nru*I or *Sma*I restriction enzymes, and hybridized with *atzF* or *ISPps1* probes targeting the *atzDEF* and the *atzABC* regions, respectively (Fig. 3, panels A and B). ADPO and ADPE showed similar hybridization profiles with the *atzF* probe, hybridizing a band of approximately 25.4 kb with *Sma*I and a 4.3-kb band with *Nru*I (Fig. 3 panel B). For *Nru*I the band observed with the *atzF* probe is in agreement with the size estimated by the pADP1 sequence *in silico* digestion, i.e. 4.4 kb. For *Sma*I the band observed in Southern blot showed a size higher than expected from the *in silico* map (i.e. 25.4 kb instead of 14 kb, respectively). This discrepancy was observed for both populations as well as for the ancestor *Pseudomonas* sp. ADP strain available in our laboratory (data not shown) indicating that it diverged from the reference pADP1 sequence (GenBank accession number U66917). However, ADPO and ADPE showed different hybridization profiles with the *ISPps1* probe (Fig. 3 panel A). For the



**Fig. 1.** Panel A. Growth curves of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) *Pseudomonas* sp. ADP populations grown in cyanuric acid mineral salt medium (MSCA). Optical density was recorded at 600 nm on one milliliter aliquots regularly taken from cell cultures (n = 3). Panel B. Cyanuric acid degradation kinetics of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP measured in cyanuric acid and mineral salt medium (MSCA) growth conditions. The amount of cyanuric acid remaining in the extracellular medium of ADPO (black circle) and ADPE (open circle) cultures was estimated by HPLC (n = 3).

**Table 2**  
Growth parameters of the ancestor (ADPO) and the newly evolved populations (ADPE) of *Pseudomonas* sp. ADP in MSCA and TY media. For cultures performed on MSCA, the maximum Optical Density ( $OD_{max}$ ) value, the maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) and the lag time ( $\lambda$ ) of ADPO and ADPE were determined by fitting the modified Gompertz model to the growth kinetic curves shown in Fig. 1A. For cultures performed on TY medium biphasic growth curves shown in Fig. 2B were modeled to compare the growth parameters of ADPO and ADPE. The parameters were subjected to a single factor analysis of normality and a Kruskal-Wallis test followed by a Fisher procedure (MSCA :  $n = 3$ , TY :  $n = 3$ ,  $p < 0.01$ ).

		$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )		$OD_{max}$ (a.u)		$\lambda$ (h)	
		ADPO	ADPE	ADPO	ADPE	ADPO	ADPE
MSAC		$0.024 \pm 0.001^*$	$0.035 \pm 0.008^*$	$0.41 \pm 0.009$	$0.40 \pm 0.007$	$5.9^*$	$3.33^*$
TY	1st phase	$0.05 \pm 0.01^*$	$0.14 \pm 0.01^*$	-	-	-	-
	2nd phase	$0.37 \pm 0.03$	$0.36 \pm 0.02$	-	-	-	-

\*For each parameter values followed by an asterisk are significantly different.

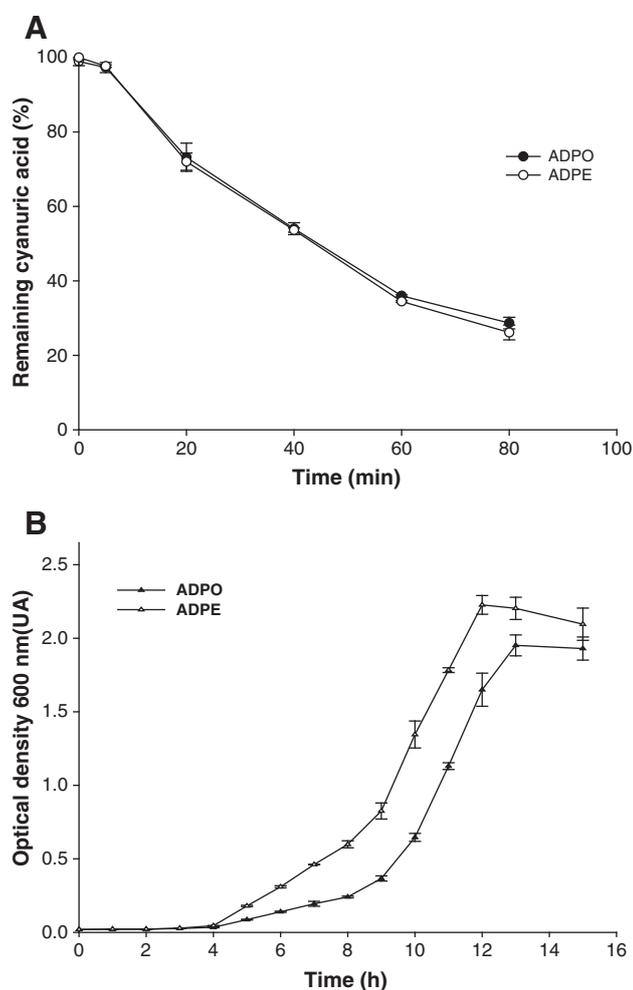
initial population, we found that with *NruI*, the *ISpps1* probe hybridized on two bands of approximately 24.6 and 11.6 kb (Fig. 3, panel A). This profile is only partially in agreement with the *in silico* digestion of pADP1 (respectively 35 155 and 12 444 bp) shown in Fig. 4 (panel A). This discrepancy was also observed for the *Pseudomonas* sp. ADP strain available in our laboratory (data not shown) indicating that it diverged from the reference pADP1 sequence (GenBank accession number U66917). With *SmaI*, the *ISpps1* probe hybridized on four bands of 18.8 kb, 10.2 kb, 8.9 kb and 7.6 kb (Fig. 3, panel A). These results are

partly in agreement with the *in silico* map of pADP1 showing only three bands of 19 647 bp, 11 549 bp and 8 051 bp (Fig. 4, panel A). For the final population, the *ISpps1* probe gave a different hybridization profile from that of the initial population. With the *NruI* restriction enzyme, only one band of approximately 6.7 kb gave a signal and with *SmaI*, only one band of approximately 8.2 kb gave a signal for the ADPE population. These results suggest that a deletion occurred on pADP1 in the region containing the four copies of the *ISpps1* and the *atzA*, *B* and *C* genes as a result of the *in vitro* evolution carried out by exerting a cyanuric acid selection pressure.

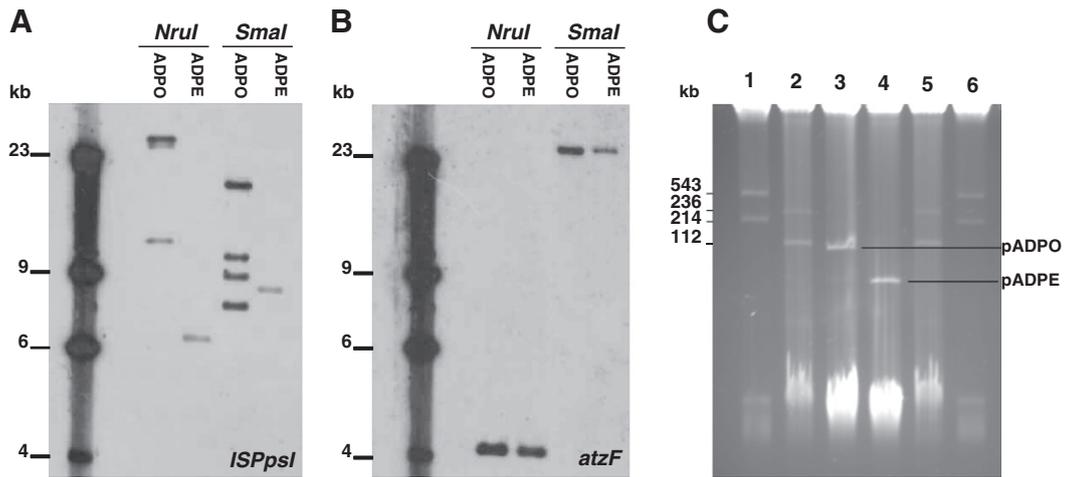
In order to further study the deletion event that had occurred in the newly evolved population, 26943 F and *trbN*R primers targeting the *traC* to *trbN* regions surrounding the deleted region were designed (Fig. 4, panel B). Long PCR performed on ADPE genomic DNA with this primer pair yielded an approximately 3-kb long amplicon. The sequence of the amplicon showed a sequence of 1 486 bp with homology to *traC* and to *ISpps1* present on pADP1 on its left side from nucleotide 26 943 to nucleotide 28 428, and a sequence of 1942 bp showing homology to the *pdhL-like* sequence and *trbN* present on pADP1 on its right side from nucleotide 74 681 to nucleotide 76 623. Interestingly, this amplicon harbors a 110-bp fragment shared by the *ISpps1* and the *pdhL-like* sequence. This suggests that this region was the site of the homologous recombination that resulted in the deletion of a 47-kb fragment in the final population. Further analysis of this 110-bp fragment with the IS Finder program (Siguier et al., 2006) showed 100% of homology to *ISpps1* of *Pseudomonas huttiensis* (GenBank ac n° AF342828).

#### 4. Discussion

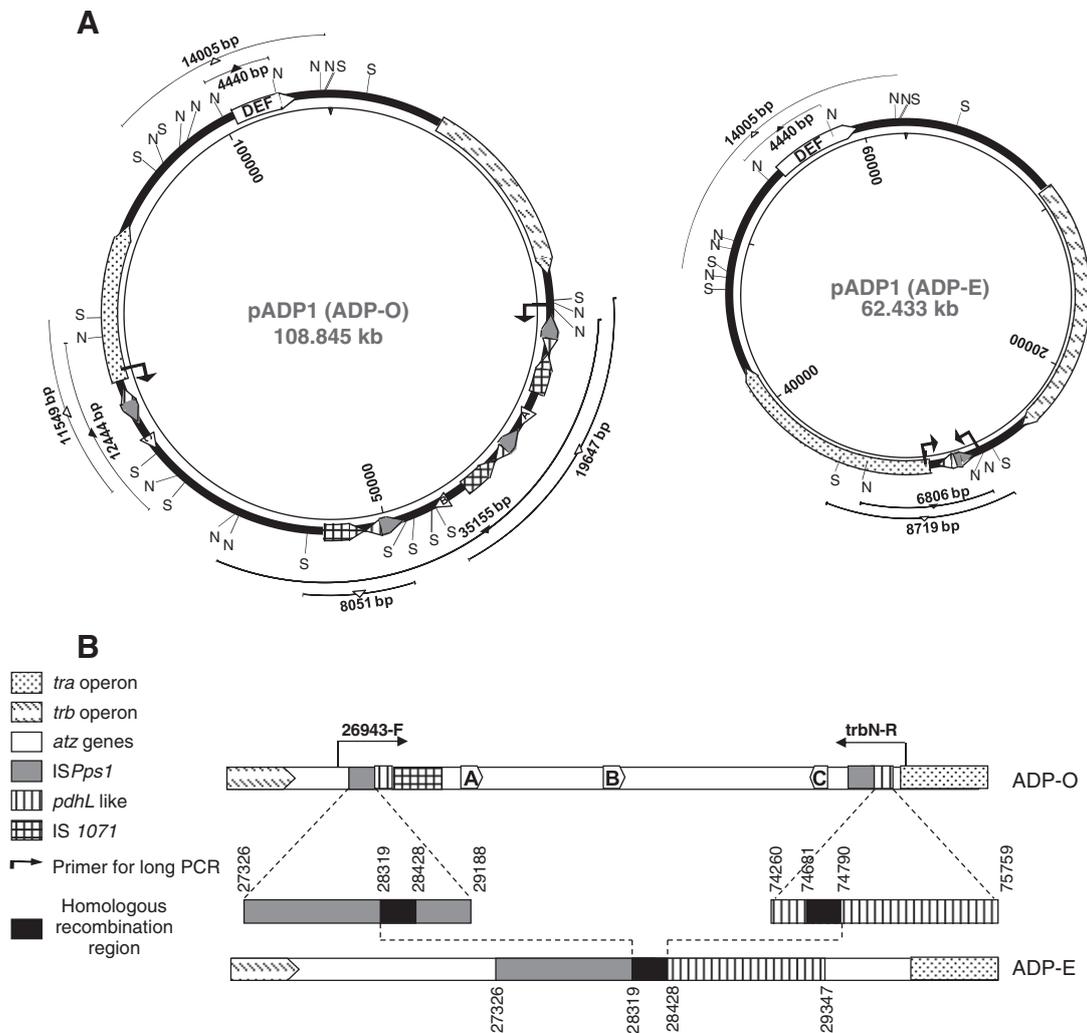
Over the past three decades, repeated atrazine applications have led to the selection of microbial populations able to mineralize this herbicide and to accelerate its degradation. A number of studies have reported the isolation and the characterization of atrazine-degrading isolates (Behki et al., 1993; Bouquard et al., 1997; Devers et al., 2007a, 2007b; Giardi et al., 1985; Mandelbaum et al., 1995; Rousseaux et al., 2001; Satsuma, 2006; Singh et al., 2004; Stamper et al., 2002; Strong et al., 2002; Struthers et al., 1998; Topp et al., 2000). Among the processes involved in the adaptation of the soil microflora to increasing atrazine degradation, horizontal gene transfer was shown to play a key role by favoring the exchange of the plasmid bearing the *atz* genes among the soil microflora (Devers et al., 2005). Homologous recombination mediated by IS elements was also shown to contribute to the evolution of the atrazine-degrading potential by (i) shifting the *atz* gene from the plasmid to the bacterial chromosome (Devers et al., 2007a, 2007b) and (ii) being responsible for the duplication of *atzB* (Devers et al., 2008). Under a favorable selection pressure the genetic plasticity allowed the atrazine-degrading potential to expand, leading to the development of this environment-friendly function. However, this genetic adaptation may result in a lower fitness for other environmental conditions and consequently *atz* gene losses may occur to recover an optimal fitness. In order to test this hypothesis, the mechanisms driving the evolution of the atrazine-degrading function were examined in an evolutionary experiment on *Pseudomonas*



**Fig. 2.** Panel A. Cyanuric acid degradation kinetics of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP estimated from crude cell extracts prepared from atrazine mineral salt medium (MSA) or cyanuric acid mineral salt medium MSCA, respectively, incubated in Knapp buffer. The amount of cyanuric acid remaining in the extracellular medium of ADPO (black circle) and ADPE (open circle) crude cell extracts was estimated by HPLC ( $n = 3$ ). Panel B. Growth curves of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) *Pseudomonas* sp. ADP populations cultivated in a rich medium. Optical density was recorded at 600 nm on one milliliter aliquots regularly taken from cell cultures ( $n = 3$ ).



**Fig. 3.** Panels A and B. Southern blot hybridization of the genomic DNA of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP. Genomic DNA was digested with either *NruI* or *SmaI* and hybridized with *ISPps1* (Panel A) or *atzF* (Panel B). DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled was loaded on the left-hand side of the gel. The sizes of the bands of the molecular weight ladder are indicated in kilobases (kb). Panel C. Plasmid profiles of original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations of *Pseudomonas* sp. ADP. The plasmid of ADPO is shown in line 3 and the plasmid of ADPE in line 4. The plasmids of known strains were used as molecular weight markers. Lines 1 and 6: *Agrobacterium tumefaciens* C58 pAT (543 kb, accession number AE007872) and pTi (214 kb, accession number AE007871). Lines 2 and 5: a derivative of *Rhizobium meliloti* 41 (GMI 328) showing a mega plasmid (>1500 kb), pRem41a::Tn7 and pRP4 with sizes of 236 and 112 kb, respectively. The sizes of the different plasmids are indicated in kilobases kb on the left-hand side of the gel.



**Fig. 4.** Panels A. *In silico* maps of pADP1 from original (ADPO) and newly evolved (ADPE) populations. *SmaI* (S) and *NruI* (N) restriction sites are shown as well as restriction fragments hybridized by *atzF* and *ISPps1* probes. *atzA*, *B*, *C*, *D*, *E* and *F* genes as well as *IS1071*, *ISPps1*, *pdhL*-like region, *trbN* and *traC* genes are shown. Panel B. Genomic organization of the pADP1 region in the original *Pseudomonas* sp. population (ADPO) delimited by *traC* and *trbN* genes (79 918 bp) and focus on the two regions involved in the deletion by homologous recombination; *ISPps1* on the left side and *pdhL*-like region on the right side. Genomic organization of the pADP1 fragment delimited by *traC* and *trbN* (33 556 bp) in the newly evolved *Pseudomonas* sp. population (ADPE) resulting from 47 kb deletion.

sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995). The population was subjected to a constant cyanuric acid selection pressure. Cyanuric acid is the intermediary metabolite formed in the early steps of the atrazine-degrading pathway made of the *atzA*, *B* and *C* genes, and it is entirely degraded by the enzymes coded by the *atzDEF* genes. Its use as the sole source of nitrogen during our *in vitro* evolution experimentation caused the prolonged starvation of the early steps of the pathway. As a result of repeated sub-culturing of *Pseudomonas* sp. ADP on cyanuric acid medium, a newly evolved population that was more competitive in growing on cyanuric acid medium was selected. We can hypothesize that the selection pressure exerted by cyanuric acid was the driving force of this population shift.

Genetic comparison of the initial and newly evolved populations revealed that a 47 kb region of pADP1 containing the *atzA*, *B* and *C* genes was deleted in the newly evolved population as a result of cyanuric acid selection pressure. The deletion event was further characterized by amplifying the remaining sequence surrounding the deletion on pADP1, i.e. the region formed between the *traC* and *trbN* genes. Sequence analysis revealed that the deletion event resulted from a homologous recombination that occurred between identical 110-bp sequences found in the IS*Pps1* on the *traC* side and in a *pdhL*-like sequence on the *trbN* side (Fig. 4). The analysis of this 110-bp direct-oriented repeated sequence with an IS finder programme showed 100% homology to IS*Pps1* of *Pseudomonas huttiensis* (e value  $e^{-177}$ ). Further analysis of the *pdhL*-like sequence of pADP1 revealed that it contained at its 3' end two sequences 100% identical to IS*Pps1* of *Pseudomonas huttiensis* (970 to 1079 and 1189 to 1500 bp 100% similar to IS*Pps1* 761 to 870 and 1 to 312 bp, respectively). Careful analysis of the *pdhL*-like sequence annotated by Martinez et al. (2001) revealed that only the first 969 nucleotides were homologous to other *pdhL* sequences. One could therefore hypothesize that the remaining 531 nucleotides at the 3' end of the *pdhL*-like sequence containing the two truncated IS*Pps1* sequences are traces of ancient genetic rearrangements mediated by IS*Pps1*. It is noteworthy that this 110-bp region is located within a motif formed by the *pdhL*-like sequence, IS1071 and IS*Pps1* and repeated several times on pADP1. The two insertion sequences found in this motif are admittedly hotspots for recombination (Reams and Neidle, 2004). They have recently been shown to be involved in the transposition of *atzAB* genes from the pADP1::Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD2 (Devers et al., 2007a, 2007b) and in the duplication of *atzB* genes in *Pseudomonas* sp. ADP (Devers et al., 2008). Our study reveals that the deletion of the *atzABC* region is mediated by a recombination within this motif and therefore suggests that it constitutes a key element for the rapid evolution of the catabolic ability of the bacterial population under selective pressure. This hypothesis is further reinforced by the observation of a slight divergence in the number of IS*Pps1* copies (i.e. four copies instead of three) on the plasmid of *Pseudomonas* sp. ADP maintained under laboratory conditions as compared to the reference strain (Genbank U66917).

Based on these observations, we hypothesize that the deletion of the region containing the *atzA*, *B* and *C* genes in the plasmid pADP1 is responsible for the improved fitness of the newly evolved *Pseudomonas* sp. ADP population. The ability of the two populations to degrade cyanuric acid assayed on crude cell extracts, thus decoupling growth from the degradation process, further reinforces this hypothesis by showing that the initial and newly evolved populations have similar degradation abilities. In order to address the impact of genetic loss on the growth ability of *Pseudomonas* sp. ADP, the growth kinetics of the two populations was estimated on a rich medium. The biphasic growth kinetics observed for both populations was composed of (i) a first phase during which the newly evolved population showed a higher growth rate than that of the original one and (ii) a second phase during which both populations presented similar growth characteristics. One could hypothesize that during the first phase, the selective advantage due to the loss of a 47 kb region on

pADP1 led to a better growth of the newly evolved population. During the second phase, similar growth parameters could be explained by the preferential growth of sub-populations having lost the entire pADP1 plasmid, initially presents in low amount in the bacterial culture, as previously suggested by Martinez et al. (2001). This observation further suggests that despite the importance of the genetic burden represented by pADP1, the genetic backgrounds of the two populations seem to be similar.

Therefore, the gain in fitness of the newly evolved population most likely does not result from an improved cyanuric acid degrading ability but from a faster growing ability due to the loss of the *atzABC* region on pADP1. Although the ISs recombination-mediated catabolic elements are well established, direct evolution studies demonstrating the selective loss of catabolic genes are scarce. Here we demonstrate that the deletion of the genetic burden constituted by the *atzABC* region and mediated by homologous recombination was selected during *in vitro* evolution of a *Pseudomonas* sp. population under cyanuric acid selection pressure. The selective loss of functional genes by different mechanisms has already been shown to be responsible for providing a net fitness gain to bacterial populations (Zinser et al., 2003). Among possible explanations, such a loss may lessen the cost for pADP1 plasmid replication thereby favoring its preservation in the population. In addition, it is noteworthy that the *atzA*, *B* and *C* genes coding for the early steps of the atrazine catabolic pathway are not transcriptionally regulated but are expressed at a basal level (Devers et al., 2004; Martinez et al., 2001), with an energy cost possibly deleterious to the original population under unfavorable selection conditions. The loss of these three *atz* genes is indeed selection-dependent, as it is a required outcome of the overall gain in fitness of the newly evolved population. As already suggested by Devers et al. (2008) and Udiković-Kolić et al. (2011), these results highlight the tremendous genetic plasticity of the atrazine-degrading bacterial community which as a result can rapidly adapt to the variations in the selection pressure exerted by atrazine and related s-triazine in the environment (Devers et al., 2008; Udiković-Kolić et al., 2011). In addition, they suggest that the selection pressure exerted by the pesticide and its main metabolites drives the expansion/reduction of the genetic potential of the pesticide-degrading community. They underline the question of the pesticide-degrading function survival in complex environmental conditions where the selection pressure varies spatially and temporally. Further work will address this question.

## Acknowledgements

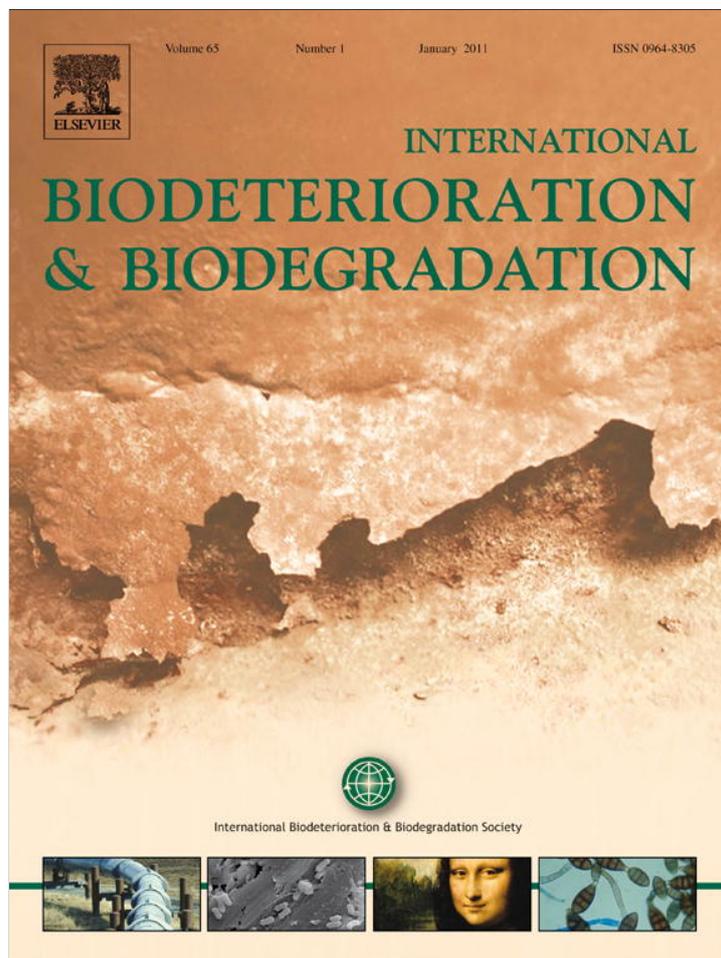
The PhD of Frédérique Changey was funded by INRA (contract n° 29000180) and Burgundy Region (contract n°07 9201 PP O24 S 4209). We would like to thank Annie Buchwalter for careful editing of the manuscript. Laurent Philippot is also thanked for helpful scientific discussion about this work.

## References

- Arber, W., 1993. Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* 135, 49–56.
- Barrick, J.E., et al., 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* 461, 1243–1247.
- Behki, R., Topp, E., Dick, W., Germon, P., 1993. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1955–1959.
- Belluck, D.A., Benjamin, S.L., Dawson, T., 1991. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites, pesticide transformation products. *Am. Chem. Soc.* 254–273.
- Bouquard, C., Ouazzani, J., Promé, J.C., Michel-Briand, Y., Plésiat, P., 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 862–866.
- De Souza, M., Wackett, L., Sadowsky, M., 1998. The *atzABC* genes encoding atrazine metabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2323–2326.
- Devers, M., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J. Microbiol. Meth.* 56, 3–15.

- Devers, M., Henry, S., Hartmann, A., Martin-Laurent, F., 2005. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (*atz*) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. *Pest Manag. Sci.* 61, 870–880.
- Devers, M., Rouard, N., Martin-Laurent, F., 2007a. Genetic rearrangement of the *atzAB* atrazine-degrading gene cassette from pADP1::Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. *Gene* 392, 1–6.
- Devers, M., El Azhari, N., Kolic, N.U., Martin-Laurent, F., 2007b. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiol. Lett.* 273, 78–86.
- Devers, M., Rouard, N., Martin-Laurent, F., 2008. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environ. Microbiol.* 10, 676–684.
- Eckhardt, T., 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584–588.
- Furuta, Y., Kawai, M., Yahara, K., Takahashi, N., Handa, N., 2011. Birth and death of genes link to chromosomal inversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1501–1506.
- García-González, V., Govantes, F., Porrua, O., Santero, E., 2005. Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J. Bacteriol.* 187, 155–167.
- Giardi, M.T., Giardina, M.C., Filacchioni, G., 1985. Chemical and biological degradation of primary metabolites of atrazine by a *Nocardia* strain. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1551–1558.
- Lawrence, J.G., 1999. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 519–523.
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., Wackett, L.P., 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the *s*-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1451–1457.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R., Sadowsky, M.J., 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* 183, 5684–5697.
- Mazel, D., Davies, J., 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 742–754.
- Parnell, J.J., et al., 2010. Functional biogeography as evidence of gene transfer in hypersaline microbial communities. *PLoS One* 5, e12919.
- Piutti, S., et al., 2003. Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 111–117.
- Reams, A.B., Neidle, E.L., 2004. Gene amplification involves site-specific short homology-independent illegitimate recombination in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Mol. Biol.* 338, 643–656.
- Roth, J.R., 2011. The joys and terrors of fast adaptation: new findings elucidate antibiotic resistance and natural selection. *Mol. Microbiol.* 79, 279–282.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Soulas, G., 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 211–222.
- Satsuma, K., 2006. Characterisation of new strains of atrazine-degrading *Nocardioides* sp isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem. *Pest Manag. Sci.* 62, 340–349.
- Siguiet, P., Filée, J., Chandler, M., 2006. Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 526–531.
- Singh, P., Suri, C.R., Cameotra, S.S., 2004. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 697–702.
- Stamper, D.M., Radosevich, M., Hallberg, K.B., Traina, S.J., Tuovinen, O.H., 2002. *Ralstonia brasiliensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using *s*-triazines as nitrogen sources. *Can. J. Microbiol.* 48, 1089–1098.
- Strong, L.C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P., 2002. *Arthrobacter aureescens* TC1 metabolizes diverse *s*-triazine ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5973–5980.
- Struthers, J.K., Jayachandran, K., Moorman, T.B., 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3368–3375.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Topp, E., Zhu, H., Nour, S.M., Houot, S., Lewis, M., Cuppels, D., 2000. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2773–2782.
- Udiković-Kolić, N., Devers-Lamrani, M., Petrić, I., Hršak, D., Martin-Laurent, F., 2011. Evidence for taxonomic and functional drift of an atrazine-degrading culture in response to high atrazine input. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1547–1554.
- Wheatcroft, R., McRae, D.G., Miller, R.W., 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3, 9–17.
- Zinser, E.R., Schneider, D., Blot, M., Kolter, R., 2003. Bacterial evolution through the selective loss of beneficial genes: trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* 164, 1271–1277.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

**This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.**

**Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.**

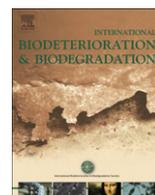
**In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:**

**<http://www.elsevier.com/copyright>**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## International Biodeterioration &amp; Biodegradation

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ibiod](http://www.elsevier.com/locate/ibiod)

## Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain

Talaat El Sebaï<sup>a</sup>, Marion Devers-Lamrani<sup>b</sup>, Frédérique Changey<sup>b</sup>, Nadine Rouard<sup>b</sup>, Fabrice Martin-Laurent<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Agricultural Microbiology Department, Agricultural Research Division, National Research Centre, El-Behouth Street, Dokki 12311, Cairo, Egypt

<sup>b</sup>INRA, Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, 17 rue sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 March 2011

Received in revised form

27 May 2011

Accepted 27 May 2011

Available online xxx

## Keywords:

Biodegradation

Atrazine

*Arthrobacter* sp.

Atz and trz genes

## ABSTRACT

The s-triazine herbicide atrazine was rapidly mineralized (i.e., about 60% of <sup>14</sup>C-ring-labelled atrazine released as <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> within 21 days) by an agricultural soil from the Nile Delta (Egypt) that had been cropped with corn and periodically treated with this herbicide. Seven strains able to degrade atrazine were isolated by enrichment cultures of this soil. DNA fingerprint and phylogenetic studies based on 16S rRNA analysis showed that the seven strains were identical and belonged to the phylogeny of the genus *Arthrobacter* (99% similarity with *Arthrobacter* sp. AD38, EU710554). One strain, designated *Arthrobacter* sp. strain TES6, degraded atrazine and mineralized the <sup>14</sup>C-chain-labelled atrazine. However, it was unable to mineralize the <sup>14</sup>C-ring-labelled atrazine. Atrazine biodegradation ended in a metabolite that co-eluted with cyanuric acid in HPLC. This was consistent with its atrazine-degrading genetic potential, shown to be dependent on the *trzN*, *atzB*, and *atzC* gene combination. Southern blot analysis revealed that the three genes were located on a large plasmid of about 175 kb and clustered on a 22-kb *Sma*I fragment. These results reveal for the first time the adaptation of a North African agricultural soil to atrazine mineralization and raise interesting questions about the pandemic dispersion of the *trzN*, *atzB* genes among atrazine-degrading bacteria worldwide.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Atrazine (2-chloro-4-(ethylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine) is an s-triazine herbicide inhibiting photosystem II that has been used extensively worldwide to control pre- and post-emergence broadleaved and grassy weeds in major crops such as maize (*Zea mays*), sorghum (*Sorghum* spp.), and sugarcane (*Saccharum officinarum*) (Pick et al., 1992; Seiler et al., 1992). Until the 1980s, atrazine application rates of up to 2 kg of active ingredient per hectare per year were used for weed control (Humburg et al., 1989). For the past two decades, lower doses (<1.5 kg of atrazine/ha/yr in agricultural crops) have been recommended in several countries to reduce its environmental impact (Seiler et al., 1992). The atrazine molecule has a relatively low solubility of approximately 30 mg l<sup>-1</sup> and a half-life in soil varying between 15 and 100 days (Protzman et al., 1999). It is persistent in groundwater (Agertved et al., 1992; Widmer and Spalding, 1995) and both the herbicide and its main metabolites (deethylatrazine and

deisopropylatrazine) are often detected in water resources at concentrations exceeding the EU regulation limit (0.1 µg l<sup>-1</sup>). In addition, several studies revealed that atrazine had toxicological impact on non-target species, such as amphibians (Sass and Colangelo, 2006) and could act as an endocrine disruptor (Singh et al., 2004). As a result, use of atrazine has recently been banned in the European Union.

Among the different processes contributing to atrazine dissipation from contaminated environments, chemical transformation occurring mainly under acidic conditions, is catalysed by soil organic matter and results in the formation of hydroxyatrazine, the hydroxylated derivative of the mother compound (Armstrong et al., 1967). Microbial biodegradation has been suggested to be the most effective process for atrazine dissipation in the soil environment. For almost 30 years, atrazine was considered to be co-metabolically degraded in soil, giving rise to deethylatrazine and deisopropylatrazine. At the end of the 90 s, atrazine mineralization was observed in soils repeatedly treated with this herbicide (Barriuso et al., 1996; Ostrofsky et al., 1997; Pussemier et al., 1997; Yassir et al., 1999; Houot et al., 2000). Mineralization was shown to be positively correlated with atrazine exposure history and soil pH (Barriuso and Houot, 1996; Pussemier et al., 1997; Vanderheyden et al., 1997;

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 8069 3406; fax: +33 3 8069 3224.  
E-mail address: [fabrice.martin@dijon.inra.fr](mailto:fabrice.martin@dijon.inra.fr) (F. Martin-Laurent).

Yassir et al., 1999; Houot et al., 2000; Hang et al., 2003; Zablutowicz et al., 2006), and negatively correlated with organic matter content and inorganic nitrogen fertilization (Alvey and Crowley, 1995; Gebendinger and Radosevich, 1999). These studies indicated that repeated application of atrazine to crops led to the development of a microbial community genetically able to mineralize this herbicide.

Since this discovery, a number of efficient atrazine-degrading microbial strains, belonging to diverse genera, have been isolated and characterized from different soils all over the world: *Nocardia* (Giardi et al., 1985), *Rhodococcus* (Behki et al., 1993), *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995), *Rhizobium* (Bouquard et al., 1997), *Alcaligenes* (De Souza et al., 1998), *Agrobacterium* (Struthers et al., 1998), *Pseudaminobacter* (Topp et al., 2000), *Chelatobacter*, *Aminobacter*, and *Stenotrophomonas* (Rousseaux et al., 2001), *Ralstonia* (Stamper et al., 2002), *Arthrobacter* (Strong et al., 2002), *Acinetobacter* (Singh et al., 2004), *Nocardioideis* (Satsuma, 2006), and *Sinorhizobium* and *Polaromonas* (Devers et al., 2007). Until now, *Pseudomonas* sp. ADP has been the most widely studied strain from which the atrazine-degrading pathway, *atzABCDEF* genes, and catabolic enzymes have been characterized (Mandelbaum et al., 1995; Martinez et al., 2001). The first three enzymes (ATZ A, B, and C) are responsible for the transformation of atrazine to cyanuric acid whereas ATZ D, E, and F catalyze the three-step mineralization of cyanuric acid. Further research revealed other genes responsible for atrazine transformation, i.e., the gene *trzN*, equivalent to *atzA*, and the gene *trzD*, equivalent to *atzD* (Mulbry, 1994; Karns, 1999). Up to now, all known atrazine-degrading isolates have been shown to harbour different *atz* and/or *trz* gene combinations (Devers et al., 2007). Most Gram-negative bacteria able to mineralize <sup>14</sup>C-ring-labelled atrazine carry the *atzA* or *trzN/atzBC* and *atzDEF* or *trzD* genes. By contrast, most Gram-positive strains able to transform atrazine to cyanuric acid carry only the *trzN* and *atzBC* genes. This intermediary metabolite can readily be used by many soil bacteria as a nitrogen source (Cook and Hutter, 1984; Cook, 1987).

This study was carried out to check for enhanced atrazine biodegradation in an agricultural field regularly exposed to s-triazine herbicide in the Nile Delta (Egypt). Enrichment cultures were conducted to isolate and characterize bacterial populations from this soil. These bacterial isolates were then taxonomically characterized by cloning and sequencing the 16S rRNA gene. Atrazine-degrading genetic potential was determined by PCR and Southern blot hybridization. The ability of one isolate to transform atrazine was characterized by HPLC and radiorespirometric analyses using <sup>14</sup>C-ethyl-chain- or ring-labelled atrazine.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Atrazine (96% technical grade) was kindly supplied by the Pesticide Laboratory Centre, Agricultural Research Centre, Ministry of Agriculture, Egypt. <sup>14</sup>C-ring-labelled atrazine (Isotopchim, specific activity 910 MBq mmol<sup>-1</sup>; 98% radiochemical purity) and <sup>14</sup>C-chain-labelled atrazine (Isotopchim, specific activity 1776 MBq mmol<sup>-1</sup>; 98% radiochemical purity) were used. An atrazine stock solution (100-ppm) was prepared in methanol and stored at 4 °C.

### 2.2. Medium

Atrazine mineral salt (AMS) medium [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.6 g l<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.4 g l<sup>-1</sup>), NaCl (0.1 g l<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.2 g l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>

(0.02 g l<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (5 mg l<sup>-1</sup>), borate (2 mg l<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1.8 mg l<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub> (0.2 mg l<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub> (0.1 mg l<sup>-1</sup>), NaMo (0.25 mg l<sup>-1</sup>), biotin (0.1 mg l<sup>-1</sup>), thiamine (0.04 mg l<sup>-1</sup>), containing atrazine as sole nitrogen source and citrate as carbon source (1 g l<sup>-1</sup>) (Devers et al., 2005) was used to perform enrichment and to culture the atrazine-degrading isolates. Atrazine at 30 ppm was used as sole nitrogen source in liquid medium. AMS solid medium prepared with 15 g of agar per litre was obtained by adding a 2-ml methanolic solution to obtain a final concentration of 500 mg l<sup>-1</sup>, which formed a chalky suspension.

### 2.3. Soil samples

Soil samples were collected in April 2006 from the top 15-cm layer of an agricultural field located at Al-Gharbia Governorate (GPS coordinates 3047.28 N and 30.59.53 E, Nile Delta, Egypt) and cropped with zucchini. This agricultural field had occasionally been cropped with corn and, consequently, had been treated with atrazine. The soil is a fertile clay presenting the following physico-chemical properties: EC 2.59 dS m<sup>-1</sup>, pH 7.72, Ca 7.5, Mg 5.0, K 0.9, Na 14.5, HCO<sub>3</sub> 0.75, SO<sub>4</sub> 20.9, Cl 6.25 (in meq l<sup>-1</sup>). Soil samples were sieved (5.0-mm mesh) to remove stones and plant debris, then stored at 4 °C in plastic bags until use. The moisture content and water-holding capacity of each soil sample were determined before beginning the experiment.

### 2.4. Atrazine mineralization potential of soil

The ability of indigenous soil microorganisms to mineralize atrazine was determined by radiorespirometry (Soulas, 1993). Briefly, soil samples (10 g equivalent dry weight) moistened to 80% of the water-holding capacity were treated with 3.60 MBq of <sup>14</sup>C-ring uniformly labelled atrazine [910 MBq mmol<sup>-1</sup>, 98% radiochemical purity (Sigma)] with added atrazine to give a final atrazine concentration of 1.5 mg kg<sup>-1</sup> soil. Three replicates were prepared. Radiorespirometers were incubated in the dark at 28 °C for 80 days. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> released from the <sup>14</sup>C-atrazine was trapped in 5 ml of 0.2 M NaOH solution and regularly analysed by liquid scintillation counting using ACS II scintillation fluid (Amersham). A second atrazine treatment was applied after 78 days of incubation under the above-described conditions.

### 2.5. Isolation of atrazine-degrading strains

Atrazine-degrading strains were isolated from enrichment cultures on an atrazine indicator plate as described previously (Mandelbaum et al., 1995). Briefly, 5 g of soil (dry weight equivalent) were added to 45 ml of AMS medium in 250-ml flasks and incubated in the dark at 30 ± 2 °C on an orbital shaker at 150 rpm. Atrazine degradation rates were estimated by measuring the concentration of atrazine remaining in the enrichment culture, using HPLC. Aliquots (0.5 ml) were periodically sampled, centrifuged to remove soil and cell debris, and then analysed by HPLC. When up to 90% of the initially added atrazine had been degraded, 5 ml of the soil suspension were transferred to fresh AMS medium and incubated under similar conditions as described above. After two successive enrichment cultures, 100-μl aliquots of fresh enrichment culture dilutions (10<sup>-2</sup> to 10<sup>-4</sup>) were plated on solid AMS medium. The plates were incubated at room temperature in the dark and were observed daily. Colonies forming a clear zone were identified as possible atrazine-degrading isolates. They were selected and further purified by repeated streaking on solid AMS medium. Isolated strains were preserved in 50% glycerol and kept frozen at -80 °C for further analyses.

## 2.6. Cloning and sequencing of 16S rDNA sequence

Bacterial DNA was extracted from the TES6 isolate using the non-organic DNA extraction kit according to the manufacturer's instructions. The 16S rRNA genes were amplified from 50 ng of DNA in a 50- $\mu$ l reaction volume containing 1.25 U of Taq polymerase (Oncor-Appligene, France), and 0.5  $\mu$ M of 27f (5'-AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3', positions 8–27 of *Escherichia coli* 16S rRNA) and 1492r (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3', positions 1492–1513 of *E. coli* 16S rRNA) primers (Gurtler and Stanisich, 1996). DNA amplification was carried out in a PTC 200 gradient cyler (MJ Research, Waltham, MA, USA) under the following conditions: 5 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 2 min at 72 °C, plus an additional 15-min cycle at 72 °C.

16S rRNA amplicons were cloned into the pGemT-EasyII plasmid according to the manufacturer's recommendations (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced by Beckman Coulter Genomics (USA). The 16S rRNA sequence was deposited in the GenBank database under the accession number HQ665017. This sequence was compared with sequences deposited in the Genbank database using BlastN. Sequences were aligned with ClustalX software. A neighbour-joining tree was constructed with the NJ Plot programme.

## 2.7. PCR assays of atrazine-degrading genes

The composition of the atrazine-degrading genes in the isolated strains was determined by PCR using the primers listed in Table 1, as previously described (Devers et al., 2008). Briefly, 50 ng of bacterial DNA were used as template for PCR reactions carried out in a 50- $\mu$ l reaction volume. The amplification conditions were as follows: 5 min at 95 °C, 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at optimal annealing temperature (Table 1), 1 min at 72 °C, plus an additional 7-min cycle at 72 °C.

## 2.8. Determination of the atrazine-degrading capacity of *Arthrobacter sp.* TES6

The ability of the isolated strain to degrade atrazine was determined. The strain was grown in AMS, harvested in the late exponential phase, washed twice in Knapp buffer, and suspended to an OD<sub>620 nm</sub> of 0.5 (i.e.,  $0.5 \times 10^6$  cfu ml<sup>-1</sup>) in the same buffer containing 50 mg l<sup>-1</sup> atrazine ( $n = 3$ ). Cell suspensions were incubated at 28 °C under agitation (125 rpm). Aliquots of the medium were taken at regular intervals throughout the incubation

period. Bacterial suspensions were centrifuged at 3000 g for 10 min. Supernatants were analysed by HPLC to monitor atrazine depletion using an LC Star system (Varian) equipped with a Microsorb-MV C18 column (length 25 cm, internal diameter 4.6 mm, Varian). The isocratic HPLC mobile phase contained methanol/ultra-pure water (75/25, v/v). The flow rate was adjusted to 1 ml min<sup>-1</sup> and chromatography was conducted at 30 °C. Atrazine was detected using a UV detector set at 220 nm.

The atrazine mineralization kinetics of the isolated bacterial population were measured by radiorespirometry using <sup>14</sup>C-ethyl-chain- or ring-labelled atrazine in Knapp buffer. Following the above-described procedure, fresh cultures of the isolated strain were used to prepare a bacterial cell suspension with an optical density of 0.5 in Knapp buffer containing 50 mg l<sup>-1</sup> of atrazine and 1.7 Kbp of <sup>14</sup>C-labelled atrazine ( $n = 3$ , for each labelling). Bacterial cell suspensions were incubated for one week at 28 °C on an orbital shaker (125 rpm) in closed sterile respirometers (250 ml) containing 0.5 M NaOH traps. The traps were regularly collected and analysed by liquid scintillation counting, described above.

## 2.9. Plasmid profiles

Cells of *Arthrobacter sp.* TES6 were grown in liquid AMS medium as described above. One millilitre of fresh culture (0.2 OD at 620 nm) was harvested and centrifuged (15,000 g for 3 min). The bacterial pellet was collected to obtain plasmid profiles using the method of Eckhardt (1978) as modified by Wheatcroft et al. (1990). Plasmid sizes were determined by calibrating against the relative mobilities of the plasmids used as standards: (i) pAT (543 kb, accession number AE007872) and pTi (214 kb, accession number AE007871) harboured by *Agrobacterium tumefaciens* C58, and (ii) a mega-plasmid (1500 kb), pRme41a::Tn7 (236 kb) and pRP4 (60 kb, accession number L27758), harboured by a derivative of *Rhizobium meliloti* 41 (GMI328).

## 2.10. Modelling of atrazine mineralization kinetics

The kinetics of atrazine mineralization were fitted to a modified Gompertz model (Zwietering et al., 1990) using Sigma plot 4.0. The model equation was:  $y = A \cdot \exp\{-\exp[1 + \mu m \cdot \exp(1)(\lambda - t)/A]\}$  where  $y$  is the percentage of mineralization (%),  $t$  is the time (h),  $\mu m$  is the maximum mineralization rate (% h<sup>-1</sup>),  $A$  is the maximum percentage of mineralization (%), and  $\lambda$  is the lag time (h). The parameters were validated by a Student's  $t$ -test ( $P < 0.005$ ).

**Table 1**  
Sequence of the primer pairs used in this study.

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')	Annealing temperature (°C)	Reference
atzA	A1f	ACG GGC GTC AAT TCT ATG AC	60	De Souza et al., 1998
	A1r	CAC CCA CCT CAC CAT AGA CC		
atzB	B1f	AGG GTG TTG AGG TGG TGA AC	60	De Souza et al., 1998
	B1r	CAC CAC TGT GCT GTG GTA GA		
atzC	Cf	GCT CAC ATG CAG GTA CTC CA	57	De Souza et al., 1998
	C1r	TCC CCC AAC TAA ATC ACA GC		
atzD	Df	GGG TCT CGA GGA TTT GAT TG	60	Devers et al., 2004
	Dr	TCC CAC CTG ACA TCA CAA AC		
atzE	Ef	GAG CCT CTG TCC GTA GAT CG	60	Devers et al., 2004
	Er	GAT GGC GTG TAC CGT TTA CC		
atzF	Ff	ACC AGC CCT TGA ATC ATC AG	60	Devers et al., 2004
	Fr	ACT TAC AAA CGC ACC GAA CC		
trzN	C190-10	CAC CAG CAC CTG TAC GAA GG	57	Mulbry et al., 2002
	C190-11	GAT TCG AAC CAT TCC AAA CG		
trzD	TrzDf1	CCT CGC GTT CAA GGT CTA CT	60	Rousseaux et al., 2001
	TrzDr1	TCG AAG CGA TAA CTG CAT TG		

### 3. Results

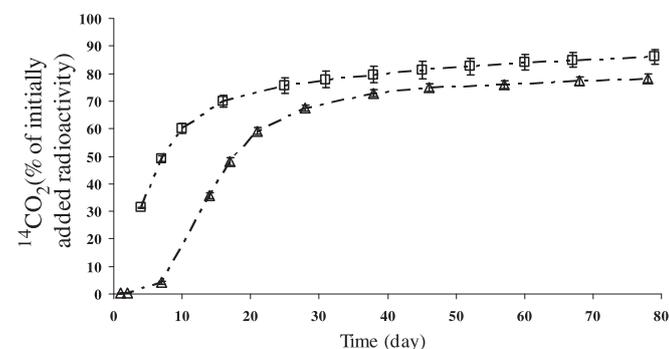
#### 3.1. Atrazine mineralization potential of the agricultural soil

The study was performed on soil collected from an agricultural field in the Nile Delta (Egypt) cropped with zucchini and intermittently exposed to atrazine. Radiorespirometric determinations of the ability of the soil microflora to mineralize atrazine showed that all the soil samples were able to mineralize this herbicide (Fig. 1). Approximately 60% of the  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled atrazine initially added was converted to  $^{14}\text{CO}_2$  over three weeks (Fig. 1). The ability of the soil microflora to mineralize atrazine was even improved by the second atrazine treatment for which a similar level of mineralization was reached within only two weeks (Fig. 1). The maximum mineralization rate ( $\mu\text{m}$ ), estimated by fitting the modified Gompertz model to the atrazine mineralization kinetics of the soil samples, was significantly higher after the second treatment ( $\mu\text{m}_2$  7.83%  $^{14}\text{CO}_2$  day $^{-1}$ ) as compared to that of the first treatment ( $\mu\text{m}_1$  4.51%  $^{14}\text{CO}_2$  day $^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). The two other kinetic parameters, i.e., maximum atrazine mineralization rate ( $A_1$  78.23 and  $A_2$  86.1%  $^{14}\text{CO}_2$ ) and lag phase ( $\lambda_1$  8 and  $\lambda_2$  2 days), were similarly affected by the repetition of the atrazine treatment. As a result of periodical exposure to atrazine, the soil microflora of this agricultural field had adapted to mineralize atrazine. In addition, the activity of the atrazine-degrading community was promoted in response to herbicide exposure, which therefore suggests the presence of specific microbial populations able to degrade this herbicide.

#### 3.2. Isolation of an atrazine-degrading bacterial strain

Enrichment cultures were used to isolate the atrazine-mineralizing strain from the Al-Gharbia field populations. Analysis of the liquid medium with HPLC revealed that the bacterial culture was able to degrade atrazine after two successive enrichments (data not shown). The bacterial culture was then serially diluted and inoculated on AMS plates. After two weeks of incubation, 12 colonies forming a clear zone due to atrazine degradation were selected. The atrazine-degrading colonies on the AMS plates were clear, buff-coloured, smooth, and circular. The purity of these colonies was verified by streaking them several times on AMS plates. The atrazine-degrading activity of the pure isolates was verified by HPLC. In total, seven of the 12 isolates showed atrazine-degrading activity.

These seven isolates gave an identical ARDRA fingerprint (data not shown). One of them (designated TES6) was chosen for further analysis. The 16S rRNA amplicon (1447 bp) of this isolate was



**Fig. 1.** Kinetics of mineralization of  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled atrazine measured in soil samples collected from an agricultural field located in Al-Gharbia Governorate (Nile Delta, Egypt) and treated either once ( $\Delta$ ) or twice ( $\square$ ) with atrazine. Error bars indicate standard error ( $n = 3$ ).

sequenced and deposited in the GenBank database under the accession number HQ665017. Blast analysis revealed that the 16S rRNA sequence of TES6 shared the highest degree of similarity (99%) with the 16S rRNA sequence of *Arthrobacter* sp. AD38 (Genbank accession number EU710554). Based on its phylogenetic relationship with several *Arthrobacter* spp. (Fig. 2), this atrazine-degrading bacterial isolate was named *Arthrobacter* sp. TES6.

#### 3.3. Characterization of the atrazine-degrading ability of *Arthrobacter* sp. TES6 and its atrazine-degrading genetic potential

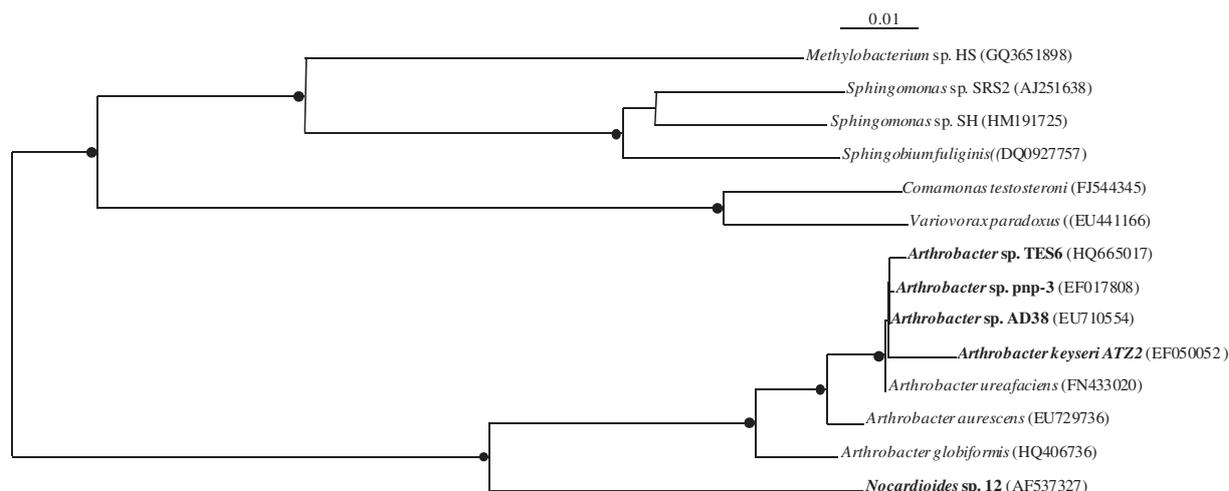
The degrading ability of *Arthrobacter* sp. TES6 was tested by HPLC. The degradation kinetics showed that *Arthrobacter* sp. TES6 completely degraded 30 ppm of atrazine within 3 h of incubation (Fig. 3). The accumulation of a metabolite co-eluting with cyanuric acid (data not shown) suggested that this strain was not able to entirely mineralize atrazine.

Radiorespirometric experiments reinforced this hypothesis since *Arthrobacter* TES6 was unable to mineralize  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled atrazine during one week of incubation. However, it was able to mineralize up to 30% of the initially added  $^{14}\text{C}$ -chain-labelled atrazine in less than 24 h of incubation (Fig. 4). These observations indicate that *Arthrobacter* sp. TES6 could only transform atrazine to cyanuric acid, a known intermediary metabolite of atrazine.

PCR amplification of *Arthrobacter* sp. TES6 DNA with various *atz* and *trz* primers yielded amplicons of the expected sizes for *trzN*, *atzB*, and *atzC*. No amplicons were detected for *atzADEF* and *trzD* genes (data not shown). The plasmid profile revealed the presence of three plasmids approximately 80, 175, and 275 kb in length. Southern blot analysis of the plasmid profiles of *Arthrobacter* sp. TES6 showed that only the 175-kb plasmid gave a hybridization signal with *trzN*, *atzB*, and *atzC* digoxigenin probes (Fig. 5B–D). In addition, Southern blot analysis performed on *Arthrobacter* sp. TES6 genomic DNA digested with *SmaI* restriction enzyme further indicated that the *trzN* and *atzBC* genes were located on the same 22-kb DNA fragment (data not shown). We therefore concluded that the atrazine-degrading potential of *Arthrobacter* sp. TES6 consisted of the *trzN*, *atzB*, and *atzC* genes. The gene products presumably dechlorinate then dealkylate atrazine, which would be consistent with the observed accumulation of cyanuric acid.

### 4. Discussion

We report for the first time the enhanced degradation of atrazine in an Egyptian agricultural soil from the Nile Delta that had been intermittently treated with this herbicide. The microflora of this soil, from the Al-Gharbia Governorate field, was able to mineralize about 60% of the initially added  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled atrazine to  $^{14}\text{CO}_2$  after only 21 days of incubation. This observation is consistent with earlier reports of enhanced atrazine degradation in agricultural soils regularly treated with this herbicide (Barriuso and Houot, 1996; Pussemier et al., 1997; Yassir et al., 1999; Houot et al., 2000; Hang et al., 2003; Zablotowicz et al., 2006; Shaner et al., 2007). It is also consistent with previous reports of high atrazine mineralization ability in agricultural soils treated every two years with this herbicide (Zablotowicz et al., 2007). However, it contradicts an earlier study conducted in Ohio that demonstrated that atrazine mineralization decreased over a 3-yr crop rotation following a single application of the herbicide, as compared to a continuous corn cropping system in which atrazine was applied once per year (Ostrofsky et al., 1997). We observed a marked increase in mineralization rate, following the second application of atrazine. As already suggested (Piutti et al., 2002), it can be hypothesized that the atrazine-degrading community grew in response to the first treatment, and was ready to mineralize the



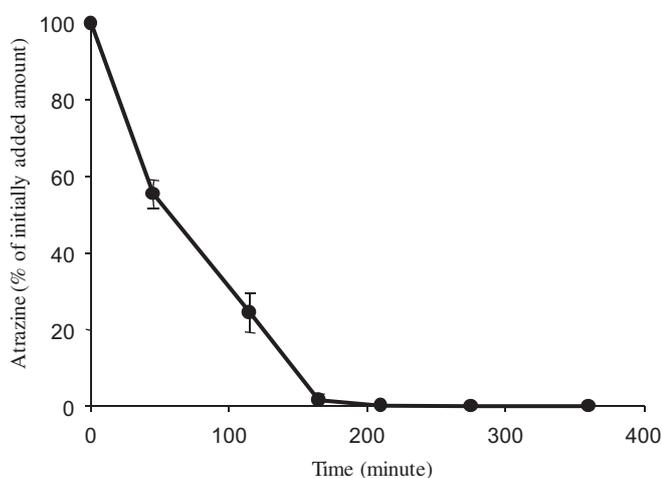
**Fig. 2.** Neighbour-joining phylogenetic analysis resulting from multiple alignment of the 16S rRNA gene of *Arthrobacter* sp. TES6 and related sequences found in the GenBank database. Atrazine-degrading isolates are in bold. Genbank accession numbers are given in brackets. Bootstrap values higher than 90% are marked as black circles. The phylogenetic distance is shown on a scale bar.

atrazine applied in the second treatment. It could be concluded that the soil microflora in the Al-Gharbia Governorate field was adapted to atrazine mineralization. This in turn indicated the presence of microbial populations genetically able to mineralize atrazine.

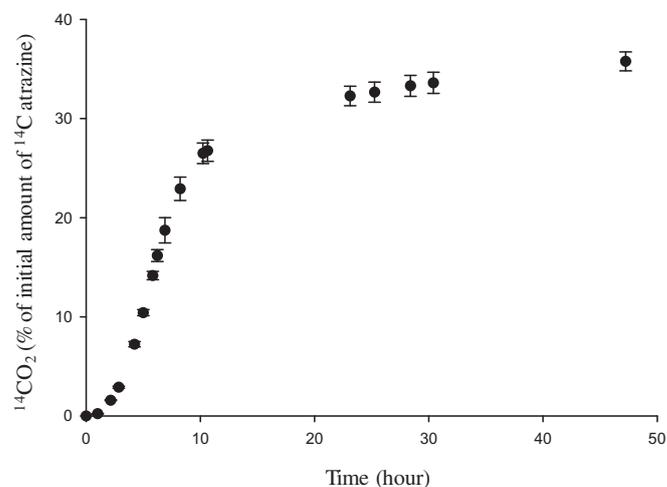
Enrichment cultures of seven isolates forming clear zones on AMS medium. They showed similar phenotypes and identical 16S rRNA fingerprints, which suggests that they were identical. It is most likely that the successive enrichment procedure led to the dominance of this atrazine-degrading bacterial population. Phylogenetic analysis, based on 16S rRNA, revealed that this isolate showed up to 99% identity with *Arthrobacter* sp. AD38 (Genbank accession number EU710554), an atrazine-degrading strain from a contaminated soil mixture. After *Arthrobacter* sp. GZK-1 isolated from Kenya, TES6 is the second atrazine-degrading strain of *Arthrobacter* to be isolated from an African agricultural field regularly treated with atrazine (Getenga et al., 2009). It is noteworthy that TES6 clustered with several other atrazine-degrading *Arthrobacter* strains isolated from geographically distant soils (including France, Croatia, the U.S., and China). This is consistent with previous reports of the isolation of Gram-positive atrazine-degrading

bacterial isolates belonging mainly to the *Arthrobacter* genus, e.g., *Arthrobacter crystallopoietes* (Rousseaux et al., 2001), *Arthrobacter aurescens* TC1 (Strong et al., 2002), *Arthrobacter* sp., AD1 (Cai et al., 2003), *Arthrobacter nicotinovorans* HIM (Aislabie et al., 2005), *Arthrobacter* sp. AG1 (Dai et al., 2007), *Arthrobacter* sp. 3A and 2B (Devers et al., 2007), *Arthrobacter* sp. MCM B-436 (Vaishampayan et al., 2007) and *Arthrobacter* sp., AD26 (Li et al., 2008).

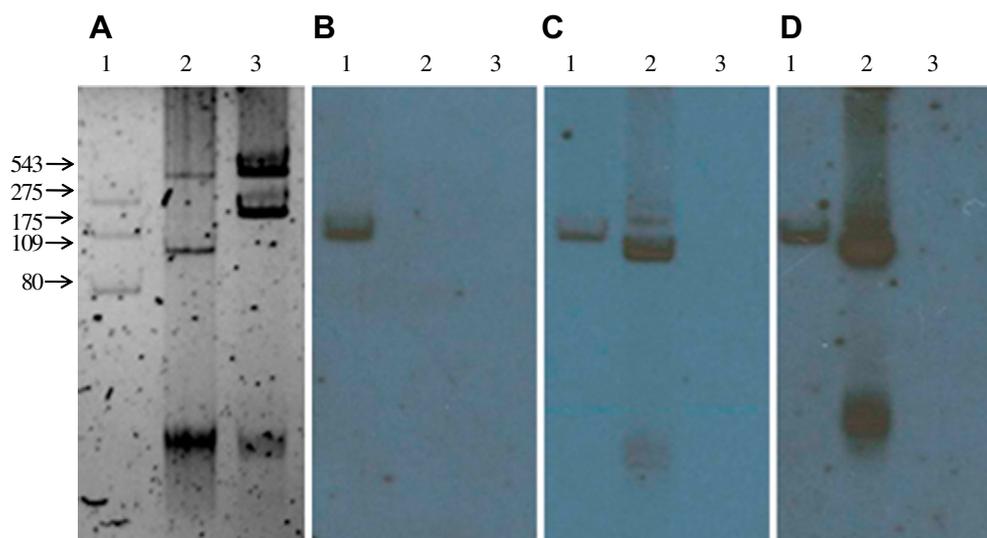
*Arthrobacter* sp. TES6 was able to completely remove 30 ppm of atrazine after only 3 h of incubation. It mineralized about 30% of the added amount of  $^{14}\text{C}$ -chain-labelled atrazine but was not able to mineralize  $^{14}\text{C}$ -ring-labelled atrazine. This is consistent with the observed accumulation of a metabolite co-eluting with cyanuric acid and suggests that TES6 only possesses the genes encoding for enzymes responsible for transforming atrazine to cyanuric acid. This hypothesis was further confirmed by its degrading genetic potential, which was found to consist of *trzN*, *atzB*, and *atzC* genes encoding the enzymes responsible for converting atrazine to cyanuric acid. Interestingly, the majority of atrazine-degrading *Arthrobacter* strains characterized to date harbour the *trzN*, *atzB*,



**Fig. 3.** Kinetics of atrazine degradation by *Arthrobacter* sp. TES6 inoculated in Knapp buffer containing  $50 \text{ mg l}^{-1}$  atrazine and incubated in the dark at  $28^\circ\text{C}$  under 150 rpm agitation. Error bars indicate standard error ( $n = 3$ ).



**Fig. 4.** Kinetics of  $^{14}\text{C}$ -chain-labelled atrazine mineralization by *Arthrobacter* sp. TES6 incubated in the dark at  $28^\circ\text{C}$  under 150-rpm agitation. Error bars indicate standard error ( $n = 3$ ).



**Fig. 5.** Panel A. Plasmid profiles of *Arthrobacter* sp. TES6 (Lane 1, plasmid size: 80, 175, and 275 kb), *Agrobacterium tumefaciens* C58 pADP1::Tn5 (Lane 2, plasmid size 109 and 543 kb), and *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Lane 3, plasmid size 214 and 543 kb). Panels B, C and D. Southern blot hybridization carried out on plasmid profiles of *Arthrobacter* sp. TES6 (Lane 1), *Agrobacterium tumefaciens* C58 pADP1::Tn5 (Lane 2), and *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Lane 3) with *trzN*, *atzB* and *atzC* digoxigenin probes, respectively.

*atzC* gene combination and are able to convert atrazine to cyanuric acid. Only two isolates, *Arthrobacter* sp. MCM B-436 harbouring the *trzN*, *atzBCD* gene combination (Vaishampayan et al., 2007) and *Arthrobacter* sp. GZK-1, for which the atrazine-degrading genetic potential remains unknown, have exhibited the capacity to completely mineralize atrazine. Therefore, the gene combination (*trzN*, *atzBC*) presented by *Arthrobacter* sp. TES6 is similar to that found in the majority of Gram-positive atrazine-degrading bacterial isolates. This atrazine-degrading gene composition was first reported in *Nocardioides* sp. SP12 (Piutti et al., 2003) and then in *A. aureescens* TC1 (Sajjaphan et al., 2004). Devers et al. (2007) detected this gene combination in several other strains belonging to the *Nocardioides* and *Arthrobacter* genera and demonstrated for the first time the presence of this gene combination in Gram-negative bacteria such as *Sinorhizobium* sp. and *Polaromonas* sp. More recently, Arbeli and Fuentes (2010) showed in a biogeographic study conducted in Columbia that the gene *trzN* was prevalent over its *atzA* analogue and could be found not only in numerous atrazine-degrading isolates belonging to the *Arthrobacter* and *Nocardioides* genera but also in the Gram-negative *Ancylobacter* genus. This reinforces the hypothesis of possible gene exchange between different genera in the order Proteobacteria, which has been further strengthened by recent demonstration of the high potential horizontal gene transfer of *trzN* by soil lysogenic viruses (Ghosh et al., 2008). Interestingly, in *Arthrobacter* sp. TES6 the *trzN*, *atzBC* genes are clustered on a 22-kb *Sma*I fragment located on a large plasmid (about 175 kb) as previously observed for *A. aureescens* TC1 (160 kb located on pAA1 of about 380 kb) and *Nocardioides* sp. 12 (14.9 kb located on a plasmid of about 200 kb) (Sajjaphan et al., 2004; Devers et al., 2007). This observation raises questions about the ways in which *atz* and *trz* genes flow within atrazine-degrading microbial communities. As recently suggested by Arbeli and Fuentes (2010), it seems that geographic barriers are not very effective for isolating *atz* and *trz* genes since the latter can be found in different strains isolated from distinct soils on different continents. This leads to interesting questions concerning the evolution and alter of *atz* and *trz* genes between atrazine-degrading communities.

In conclusion, this is the first report of isolation of a soil-borne microbial strain from an agricultural soil in Egypt, *Arthrobacter* sp. TES6, adapted to atrazine mineralization and able to efficiently

degrade this herbicide. This bacterial isolate harbours the *trzN*, *atzBC* gene combination responsible for converting atrazine to cyanuric acid. This report is the first to identify the presence of this atrazine-degrading gene combination on the African continent and confirms the worldwide dispersion of this *trzN*, *atzBC* gene combination.

#### Acknowledgements

We would like to thank Dr. Nabil Emera (Pests and Plant Protection Department, National Research Centre, Cairo, Egypt) for providing the soil used in this study, and Dr. Alaa Marzok (Laboratory Centre of Pesticides, Institute of Agricultural Research, Cairo, Egypt) for generously supplying the atrazine active ingredient used in this study. We would also like to acknowledge Diana Warwick for carefully editing our manuscript.

#### References

- Agertved, J., Rugge, K., Barker, J.F., 1992. Transformation of the herbicides MCP and atrazine under natural aquifer conditions. *Ground Water* 30, 500–506.
- Aislabie, J., Bej, A.K., Ryburn, J., Lloyd, N., Wilkins, A., 2005. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology* 52, 279–286.
- Alvey, S., Crowley, D.E., 1995. Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen source. *Journal of Environmental Quality* 24, 1156–1162.
- Arbeli, Z., Fuentes, C., 2010. Prevalence of the gene *trzN* and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from 13 Colombian agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 611–623.
- Armstrong, D.E., Chesters, G., Harris, R.F., 1967. Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Science Society of American Proceedings* 31, 61–66.
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., Soulas, G., 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols: Transformations et dissipation. *Etudes et Gestions des Sols* 3/4, 279–295.
- Barriuso, E., Houot, S., 1996. Rapid mineralization of the s-triazine ring atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1341–1348.
- Behki, R., Topp, E., Dick, W., Germon, P., 1993. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1955–1959.
- Bouquard, C., Ouazzani, J., Promé, J.C., Michel-Briand, Y., Plésiat, P., 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 862–866.
- Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y., Jiang, S., 2003. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology* 36, 272–276.

- Cook, A.M., Hutter, R., 1984. Deethylsimazine - bacterial dechlorination, deamination, and complete degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 581–585.
- Cook, A.M., 1987. Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 93–116.
- Dai, X.Z., Jiang, J.D., Gu, L.F., Pan, R.Q., Li, S.P., 2007. Study on the atrazine-degrading genes in *Arthrobacter* sp. AG1. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 23, 789–793.
- De Souza, M.L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P., 1998. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology* 180, 1951–1954.
- Devers, M., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2004. Realtime reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods* 56, 3–15.
- Devers, M., Henry, S., Hartmann, A., Martin-Laurent, F., 2005. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (*atz*) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. *Pest Management Science* 61, 870–880.
- Devers, M., El Azhari, N., Kolic, N.U., Martin-Laurent, F., 2007. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS Microbiology Letters* 273, 78–86.
- Devers, M., Rouard, N., Martin-Laurent, F., 2008. Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology* 10, 676–684.
- Eckhardt, T., 1978. A rapid method for identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584–588.
- Gebendinger, N., Radosevich, M., 1999. Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M91-3. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 375–381.
- Getenga, Z., Dorfler, U., Iwobi, A., Schmid, M., Schroll, R., 2009. Atrazine and terbutylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere* 77, 534–539.
- Ghosh, D., Roy, K., Williamson, K.E., White, D.C., Wommack, K.E., Sublette, K.L., Radosevich, M., 2008. Prevalence of lysogeny among soil bacteria and presence of 16S rRNA and *trzN* genes in viral-community DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 495–502.
- Giardi, M.T., Giardina, M.C., Filacchioni, G., 1985. Chemical and biological degradation of primary metabolites of atrazine by a *Nocardia* strain. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 1551–1558.
- Gurtler, V., Stanisch, V., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3–16.
- Hang, S., Barriuso, E., Houot, S., 2003. Behavior of <sup>14</sup>C-atrazine in Argentinean topsoils under different cropping managements. *Journal of Environmental Quality* 32, 2216–2222.
- Houot, S., Topp, E., Yassir, A., Soulas, G., 2000. Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 615–625.
- Humburg, N.E., Colby, S.R., Lym, R.G., Hill, E.R., McAvoy, W.J., Kitchen, K.M., Prasad, R., 1989. *Herbicide handbook of the weed science society of America*, sixth ed. WSSA, Champaign IL, pp. 17–20.
- Karns, J.S., 1999. Gene sequence and properties of an s-triazine ring-cleavage enzyme from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3512–3517.
- Li, Q.Y., Li, Y., Zhu, X.K., Cai, B.L., 2008. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences-China* 20, 1226–1230.
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., Wackett, L.P., 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1451–1457.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R., Sadowsky, M.J., 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. ADP. *Journal of Bacteriology* 183, 5684–5697.
- Mulbry, W.M., 1994. Purification and characterization of an inducible s-triazine hydrolase from *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 613–618.
- Mulbry, W.M., Zhu, H., Nour, S.M., Topp, E., 2002. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioideis* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* 449, 75–79.
- Ostrofsky, E.B., Traina, S.J., Tuovinen, O.H., 1997. Variation in atrazine mineralization rates in relation to agricultural management practice. *Journal of Environmental Quality* 26, 647–657.
- Pick, F.E., Vandyk, L.P., Botha, E., 1992. Atrazine in ground and surface-water in maize production areas of the Transvaal, South-Africa. *Chemosphere* 25, 335–341.
- Piutti, S., Hallet, S., Rousseaux, S., Philippot, L., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2002. Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils* 36, 434–441.
- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2003. Isolation and characterisation of *Nocardioideis* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Letters* 221, 111–117.
- Protzman, R., Lee, P., Ong, S., Moorman, T., 1999. Treatment of formulated atrazine rinsate by *Agrobacterium radiobacter* strain J14a in a sequencing batch biofilm reactor. *Water Research* 33, 1399–1404.
- Pussemier, L., Goux, S., Vanderheyden, V., Debongnie, P., Trésinie, I., Foucart, G., 1997. Rapid dissipation of atrazine in soils taken from various maize fields. *Weed Research* 37, 171–179.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Soulas, G., 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 211–222.
- Sajjaphan, K., Shapir, N., Wackett, L.P., Palmer, M., Blackmon, B., Tomkins, J., Sadowsky, M.J., 2004. *Arthrobacter aureus* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4402–4407.
- Sass, J.B., Colangelo, A., 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 12, 260–267.
- Satsuma, K., 2006. Characterisation of new strains of atrazine-degrading *Nocardioideis* sp isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem. *Pest Management Science* 62, 340–349.
- Seiler, A., Brenneisen, P., Green, D.H., 1992. Benefits and risks of plant protection products. Possibilities of protecting drinking water: case atrazine. *Water Supply* 10, 31–42.
- Shaner, D.L., Henry, W.B., Krutz, L.J., Hanson, B., 2007. Rapid assay for detecting enhanced atrazine degradation in soil. *Weed Science* 55, 528–535.
- Singh, P., Suri, C.R., Cameotra, S.S., 2004. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 317, 697–702.
- Soulas, G., 1993. Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 443–449.
- Stamper, D.M., Radosevich, M., Hallberg, K.B., Traina, S.J., Tuovinen, O.H., 2002. *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 1089–1098.
- Strong, L.C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P., 2002. *Arthrobacter aureus* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5973–5980.
- Struthers, J.K., Jayachandran, K., Moorman, T.B., 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3368–3375.
- Topp, E., Mulbry, W.M., Zhu, H., Nour, S.M., Cuppels, D., 2000. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioideis* sp. isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3134–3141.
- Vaishampayan, P.A., Kanekar, P.P., Dhakephalkar, P.K., 2007. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60, 273–278.
- Vanderheyden, V., Debongnie, P., Pussemier, L., 1997. Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. *Pesticide Science* 49, 237–242.
- Wheatcroft, R., McRae, D.G., Miller, R.W., 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 3, 9–17.
- Widmer, S.K., Spalding, R.F., 1995. A natural gradient transport study of selected herbicides. *Journal of Environmental Quality* 24, 445–453.
- Yassir, A., Lagacherie, B., Houot, S., Soulas, G., 1999. Microbial aspects of atrazine biodegradation in relation to history of soil treatment. *Pesticide Science* 55, 799–809.
- Zablutowicz, R.M., Weaver, M.A., Locke, M.A., 2006. Microbial adaptation for accelerated atrazine mineralization/degradation in Mississippi Delta soils. *Weed Science* 54, 538–547.
- Zablutowicz, R.M., Krutz, L.J., Reddy, K.N., Weaver, M.A., Koger, C.H., Locke, M.A., 2007. Rapid development of enhanced atrazine degradation in a Dundee silt loam soil under continuous corn and in rotation with cotton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 852–859.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Van Riet, K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875–1881.



## Résumé

L'atrazine, un des herbicides les plus utilisés pour contrôler le développement des plantes adventices dans les cultures, a conduit à la contamination de l'environnement. L'exposition chronique à cet herbicide a conduit à l'émergence de populations microbiennes du sol capables de dégrader l'atrazine et de l'utiliser comme une source d'azote pour leur croissance. Ces populations microbiennes sont responsables de la biodégradation accélérée (BDA) de l'atrazine, un service écosystémique contribuant à diminuer la persistance de cet herbicide dans l'environnement. L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes génétiques et physiologiques responsables du fonctionnement et de l'amélioration de ce service écosystémique. Nous avons appliqué une démarche expérimentale allant des gènes codant la dégradation à des communautés microbiennes afin d'identifier les processus adaptatifs impliqués dans l'évolution de la fonction de BDA de l'atrazine.

Le premier volet a consisté à évaluer l'importance de mutations accumulées dans le gène *atzA* dans la transformation de l'atrazine en hydroxyatrazine catalysée par AtzA. Le séquençage de gènes *atzA* de différents isolats bactériens dégradant l'atrazine (*Pseudomonas* sp. ADP WT, *Pseudomonas* sp. ADP Ps et différents *Chelatobacter heintzii*) a montré que la séquence du gène *atzA* était très conservée. Toutefois quatre mutations non silencieuses ont pu être identifiées (1 chez *Pseudomonas* sp. ADP MSE et 3 chez *Chelatobacter heintzii*). La modélisation de la structure de la protéine AtzA a permis de montrer que trois des mutations étaient situées dans des régions importantes (site actif, poche de liaison avec l'atrazine et liaison avec le métal Fe<sup>2+</sup>). Afin de caractériser l'importance de ces mutations, l'activité de dégradation des différentes isoformes d'AtzA et de protéines obtenues par une approche de mutagenèse dirigée a été mesurée. Ces études montrent que la mutation observée chez *Pseudomonas* sp. ADP Ps diminue l'activité de dégradation d'AtzA par rapport à celle de *Pseudomonas* sp. ADP WT tandis que les mutations observées chez *C. heintzii* diminuent l'activité de dégradation de l'atrazine mais favorise celle de dégradation de la simazine. La fixation de ces mutations pourrait être expliquée (i) par le relâchement de la pression de sélection exercée sur *atzA* pour la population *Pseudomonas* sp. ADP Ps et (ii) par la sélection de populations capables d'accéder à deux s-triazines, respectivement.

Le second volet a consisté à étudier la plasticité de la voie de biodégradation de l'atrazine dans deux conditions opposées : (i) la première visait à évaluer la persistance de la capacité de dégradation en absence de pression de sélection et (ii) la seconde visait à évaluer l'évolution de la capacité de dégradation en présence d'une pression de sélection élevée. Pour conduire ces études, des manipulations d'évolution expérimentale sur *Pseudomonas* sp. ADP ont été menées. (i) L'exposition à l'acide cyanurique, intermédiaire métabolique de l'atrazine, a conduit à la sélection d'une population nouvellement évoluée capable de croître plus rapidement dans un milieu de culture ne contenant que l'acide cyanurique comme source d'azote. Cette population est caractérisée par une délétion d'une région de 47 kb du plasmide ADP1 contenant les gènes *atzABC*. Les analyses conduites ont permis de conclure que le gain de compétitivité de la population évoluée résidait dans la perte du fardeau génétique représenté par la région de 47 kb, la capacité de dégradation de l'acide cyanurique restant inchangée. (ii) L'exposition à l'atrazine a conduit à la sélection d'une population nouvellement évoluée caractérisée par l'insertion du plasmide ADP1 en quasi-totalité sur le chromosome bactérien. Cet événement génétique ne contribue à améliorer ni la croissance ni la dégradation de l'atrazine. Le gain de compétitivité de la souche évoluée pourrait résider dans la stabilité de la transmission verticale de la fonction de biodégradation. Ces deux expériences montrent que la plasticité des génomes microbiens contribue à l'adaptabilité de la fonction de biodégradation de l'atrazine.

Le troisième volet a consisté à développer un outil permettant d'évaluer, à l'échelle d'une communauté microbienne synthétique, l'évolution du potentiel génétique dégradant. Pour ce faire quatre souches dégradantes dont une, *Arthrobacter* sp. TES6, isolée au cours de cette étude, ont été choisies. Présentant des fonds génétiques et potentiels dégradants différents, elles ont été manipulées afin de leur conférer des résistances à des antibiotiques permettant de les sélectionner. Une expérience d'évolution a été initiée afin de valider l'outil. Les premières analyses montrent qu'il est fonctionnel et, qu'à terme, il devrait permettre d'étudier l'évolution du potentiel génétique dégradant d'un consortium placé dans différentes conditions environnementales.

Ces travaux montrent que la fonction de biodégradation accélérée de l'atrazine est très versatile et qu'elle est en constante évolution. Il met en évidence que le principal facteur pilotant cette évolution est le niveau d'exposition des populations dégradantes au pesticide.

**Mots clefs :** biodégradation, atrazine, évolution expérimentale, gène *atz*, séquences d'insertion