



**Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de l'Université de Strasbourg**

**Discipline :** Sciences du vivant

**Mention :** Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

## **Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants**

Présentée par :

**Marie Marchal**

Soutenue publiquement le 17 novembre 2010

Composition du jury :

Christophe Beloin	Institut Pasteur, Paris	Rapporteur externe
Max Mergeay	Université Libre de Bruxelles	Rapporteur externe
Isabelle Martin-Verstraete	Université Paris Diderot-Paris 7	Examinateuse externe
Valérie Geoffroy	Université de Strasbourg	Examinateuse interne
Marie-Christine Dictor	BRGM, Orléans	Invitée
Romain Briandet	INRA, Massy	Invité
Philippe Bertin	Université de Strasbourg	Directeur de thèse
Marie-Claire Lett	Université de Strasbourg	Co-directrice de thèse

*Equipe Ecophysiologie moléculaire des micro-organismes  
Laboratoire de Génétique moléculaire, génomique et microbiologie  
UMR7156 CNRS et Université de Strasbourg  
28, rue Goethe, 67000 STRASBOURG (France)*



# REMERCIEMENTS

---

Cette thèse a été financée par l'ANR PRECODD (projet COBIAS) et a été réalisée au sein du laboratoire de Génétique Moléculaire Génomique et Microbiologie de l'Université de Strasbourg (UMR7156) dirigé par Serge Potier. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je tiens à remercier particulièrement Philippe Bertin et Marie-Claire Lett pour avoir dirigé ce travail de thèse, ainsi que Florence Arsène-Ploetze pour ses remarques constructives et son aide précieuse.

Je remercie également les autres membres de l'équipe, Sandrine, David, Lucie, Jessica, François et Didier pour leur disponibilité et leur soutien.

Je n'oublie pas toutes les personnes du laboratoire qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidée dans ce travail.

Je remercie vivement Romain Briandet pour m'avoir initiée à la microscopie confocale ainsi que pour ses nombreux conseils.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.



# **SOMMAIRE**

---

---

<b>Introduction générale .....</b>	<b>7</b>
<b>A. Définition et résistance au sein des biofilms bactériens .....</b>	<b>8</b>
I. Notions générales.....	8
1. Définition et composition .....	8
2. Organisation et rôle de la matrice extracellulaire .....	10
II. Structures de résistance .....	11
1. Limitation de la diffusion.....	11
2. Phénotype spécifique du biofilm régulé par le quorum-sensing.....	12
a. Phénotype spécifique du « biofilm » .....	12
b. Quorum-sensing.....	13
3. Hétérogénéité phénotypique .....	14
a. Hétérogénéité physiologique spatialement organisée.....	15
b. Hétérogénéité phénotypique liée à l'expression aléatoire des gènes .....	16
4. Hétérogénéité génétique .....	19
5. Conclusion .....	21
<b>B. Cinétique de développement d'un biofilm .....</b>	<b>22</b>
I. Initiation du biofilm .....	23
1. Transition entre les états planctoniques et sessiles.....	23
a. Rôle de la mobilité flagellaire et du chimiotactisme dans l'initiation du biofilm .....	23
b. Rôle du monophosphate cyclique di-guanilique ( <i>c-di-GMP</i> ) .....	25
2. Adhésion à la surface.....	28
a. Forces mises en jeu.....	29
b. Structures et propriétés impliquées dans l'adhésion.....	29
II. Formation et maturation des structures .....	31
1. Formation des microcolonies.....	31
2. Différenciation du biofilm et interactions entre les cellules.....	32
a. Caractéristiques de la population d'un biofilm mature .....	33
b. Rôle du quorum-sensing .....	33
c. Interactions entre les cellules .....	33
3. Evénements de mort et lyse cellulaires localisés.....	34
a. Hétérogénéité physiologique du biofilm.....	34
b. Mort et lyse cellulaires programmées .....	35
c. Cannibalisme et fratrie .....	38
d. Conclusion : l'altruisme dans les biofilms.....	39
III. Dispersion du biofilm .....	39
1. Signaux environnementaux et régulation de la dispersion des cellules.....	40
2. Mécanismes de détachement .....	40

a.	<i>Dégénération de la matrice extracellulaire</i> .....	40
b.	<i>Changement des propriétés de membrane</i> .....	42
c.	<i>Remobilisation des cellules</i> .....	42
3.	<b>Régulation de l'étape de dispersion</b> .....	42
a.	<i>Régulation par le quorum-sensing</i> .....	43
b.	<i>Autres molécules-signal</i> .....	43
4.	<b>Conclusion : caractéristiques de la population dispersée</b> .....	44
C.	<b>Implications des biofilms <i>in situ</i> et en bioremédiation</b> .....	45
I.	<b>Impacts et bénéfices des biofilms sur l'homme et l'environnement</b> .....	45
1.	<b>Les biofilms dans le domaine médical</b> .....	45
2.	<b>Biofilms bénéfiques et néfastes dans l'industrie</b> .....	46
a.	<i>Impacts négatifs des biofilms dans l'industrie</i> .....	46
b.	<i>Utilisation des exopolysaccharides dans l'industrie</i> .....	47
3.	<b>Impact des biofilms dans l'environnement</b> .....	47
a.	<i>Rôle des biofilms dans les cycles géochimiques</i> .....	47
b.	<i>Utilisation des biofilms dans les procédés de bioremédiation</i> .....	47
c.	<i>Bioremédiation des métaux et métalloïdes</i> .....	49
II.	<b>Bioremédiation des eaux contaminées par l'arsenic</b> .....	50
1.	<b>Généralités sur l'arsenic</b> .....	50
a.	<i>L'arsenic dans les aquifères</i> .....	50
b.	<i>Toxicité et normes</i> .....	52
c.	<i>Métabolismes bactériens de l'arsenic</i> .....	54
2.	<b>Remédiation des eaux contaminées par l'arsenic</b> .....	55
a.	<i>Remédiation chimique</i> .....	55
b.	<i>Bioremédiation</i> .....	56
c.	<i>Caractéristiques de la population microbienne d'intérêt</i> .....	57
	<b>Objectifs</b> .....	59
	<b>Chapitre 1. Physiologie et génomique des souches du genre <i>Thiomonas</i></b> .....	63
A.	<b>Introduction</b> .....	64
B.	<b>Etude physiologique de souches du genre <i>Thiomonas</i></b> .....	67
C.	<b>Comparaison génomique de souches du genre <i>Thiomonas</i></b> .....	81
D.	<b>Discussion et conclusion</b> .....	107
I.	<b>Métabolismes de l'arsenic et du carbone chez des souches du genre <i>Thiomonas</i></b> ..	107
II.	<b>Comparaison génomique des souches du genre <i>Thiomonas</i></b> .....	109
	<b>Chapitre 2. Effets de l'arsenic sur la cinétique de développement de biofilms</b> .....	111
A.	<b>Introduction</b> .....	112

---

B. Impact de l'arsénite sur l'initiation du biofilm d' <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> .....	115
C. Modification de la dynamique structurelle du biofilm de <i>Thiomonas</i> sp. CB2 en réponse à l'arsénite.....	125
I. Manuscrit.....	125
II. Matériel et méthodes supplémentaires : étude des particules de type phagique ..	145
1. Récupération des particules de type phagique .....	145
2. Analyse des protéines extracellulaires contenues dans le biofilm .....	145
3. Extraction des acides nucléiques des particules de type phagique .....	147
III. Résultats complémentaires .....	147
D. Discussion et conclusion .....	151
I. Impact de l'As(III) sur les fonctions clés de la formation du biofilm d' <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> .....	151
II. Dynamique structurelle du biofilm de <i>Thiomonas</i> sp. CB2 en présence d'As(III) ..	154
Conclusion générale et perspectives .....	157
Annexe .....	163
Références.....	199

# **INTRODUCTION GENERALE**

---

## A. Définition et résistance au sein des biofilms bactériens

---

### I. Notions générales

#### 1. Définition et composition

Dans l'environnement, les bactéries vivent préférentiellement sous forme de biofilms (Costerton *et al.*, 1995; Zobell, 1943). Ce sont des associations denses et structurées de microorganismes entourés d'une matrice extracellulaire, qui se développent sur des surfaces telles que des tissus vivants, des appareils médicaux et agro-industriels, des systèmes de distribution d'eau et dans les systèmes naturels aquatiques. Ces organisations microbiennes permettent aux bactéries de se maintenir dans une niche écologique et de résister à de nombreux stress environnementaux tels que le pH, l'oxygène, la dessiccation et les composés bactéricides, grâce à la combinaison de différents mécanismes (voir sous-section suivante **II. Structures de résistance**). De manière générale, le cycle de vie d'un biofilm se découpe en trois étapes : l'adhésion des cellules à une surface, la maturation du biofilm, et la dispersion des cellules (voir section **B. Cinétique de développement du biofilm**). En fonction du stade de développement, la population d'un biofilm se distingue d'une population planctonique par de nombreux aspects, dont un taux de croissance réduit, la régulation de gènes spécifiques et la synthèse d'une matrice extracellulaire (Donlan, 2002).

La composition et les propriétés physiques de la matrice extracellulaire entourant les cellules varient en fonction des espèces et des facteurs environnementaux. De manière générale, elle est fortement hydratée et composée de substances polymériques (Extracellular Polymeric Substances, EPSs), à savoir des polysaccharides (entre 40 et 95% de son poids sec), des protéines (<1-60%), des acides nucléiques (<1-10%) et des lipides (<1-40%) (Flemming & Wingender, 2010).

Les **polysaccharides** extracellulaires assurent le maintien et la cohésion du biofilm. Ils sont classés en deux catégories en fonction de leur liaison aux cellules : les polysaccharides capsulaires, fortement liés à la paroi bactérienne, et les exopolysaccharides, libérés dans le milieu extérieur (Branda *et al.*, 2005). Leur biosynthèse est réalisée en deux étapes à partir de groupements uridine diphosphate-sucre. Des glycosyl transférases transfèrent ces groupements sur des lipides. Ceux-ci permettent leur transport hors de la cellule où a lieu la polymérisation (Pollock *et al.*, 1998). Les polysaccharides retrouvés le plus fréquemment dans les biofilms sont la cellulose (*E. coli*, *Salmonella Typhimurium* et bactéries Gram négatives en général), l'acide colanique (entérobactéries) et le poly-*N*-acetylglucosamine (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Yersinia pestis*) (Danese *et al.*, 2000; Izano *et al.*, 2008; Ratto *et al.*, 2006). Une espèce bactérienne est capable de synthétiser des polysaccharides de nature différente. Le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* est par exemple composé d'alginate et de polysaccharides riches en mannose et galactose (Psl) ou glucose (Pel) (Ryder *et al.*, 2007).

Les **protéines** retrouvées dans la matrice extracellulaire jouent un rôle structurel et assurent en partie la communication entre les cellules au sein du biofilm. Les curli, structures protéiques adhésives de surface, permettent par exemple l'agrégation de cellules d'*E. coli*. Les pili synthétisés pour assurer le transfert de plasmides conjuguatifs sont eux essentiels au développement du biofilm car ils favorisent les contacts cellulaires et induisent ainsi la formation d'acide colanique et de curli (Da Re *et al.*, 2007; Ghigo, 2001; May & Okabe, 2008).

Des **acides nucléiques** sont retrouvés dans la matrice extracellulaire suite à la lyse de cellules (Allesen-Holm *et al.*, 2006) ou par l'intermédiaire de vésicules membranaires (Whitchurch *et al.*, 2002). Ils jouent un rôle fondamental dans l'architecture et la stabilité du biofilm en favorisant les interactions acide-base entre les différents composants de la matrice et les cellules (Das *et al.*, 2010; Whitchurch *et al.*, 2002). L'ADN extracellulaire est aussi impliqué dans le processus d'adhésion chez certaines souches bactériennes comme *Listeria monocytogenes* et *S. aureus* (Harmsen *et al.*, 2010; Mann *et al.*, 2009).

Enfin, la matrice d'un biofilm contient, en proportions variables, des **lipides**. En plus de lipides et phospholipides composant les cellules, des vésicules membranaires provenant de la membrane externe des cellules peuvent être présentes dans des biofilms de bactéries Gram négatives. Elles présentent une activité protéolytique et sont capables d'interagir avec les composés bactéricides, participant ainsi à la résistance du biofilm aux stress environnementaux (Schooling & Beveridge, 2006). Ces vésicules assurent aussi le transfert d'ADN extracellulaire au sein du biofilm (Schooling *et al.*, 2009).

## 2. Organisation et rôle de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire assure la cohésion de la communauté bactérienne et permet la mise en place d'une architecture complexe et ainsi de différents microenvironnements. L'architecture et la composition d'un biofilm varient en fonction des espèces et des conditions environnementales (Tolker-Nielsen & Molin, 2000). De manière générale, le biofilm est composé d'agrégats de cellules – les microcolonies – englués dans une matrice d'EPSs et séparés les uns des autres par des canaux d'eau permettant entre autres la diffusion de nutriments et de molécules signal (Donlan, 2002). Un biofilm peut être composé d'une monocouche de cellules ou au contraire constituer une structure tridimensionnelle très élaborée. L'architecture d'un biofilm, hétérogène dans l'espace, fluctue dans le temps en fonction de facteurs internes et externes (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000).

Dans l'environnement, les biofilms sont généralement constitués de plusieurs espèces bactériennes. L'organisation tridimensionnelle de ces communautés permet le maintien des interactions entre les microorganismes au cours du temps, ce qui leur confère un avantage écologique par rapport à leurs équivalents planctoniques (Flemming & Wingender, 2010).

## II. Structures de résistance

Il est communément admis que les bactéries privilégient un mode de vie sessile à un mode de vie planctonique (Davey & O'Toole G, 2000). Les cellules vivant en biofilm peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux composés bactéricides que les cellules planctoniques, ce qui indique l'existence de mécanismes de résistance différents entre les deux modes de vie (Drenkard, 2003; Mah & O'Toole, 2001). Dans les biofilms, la résistance aux stress environnementaux est un processus multifactoriel. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer ce phénomène : la faible diffusion des composés toxiques dans la matrice extracellulaire, l'existence d'un phénotype spécifique au biofilm, l'hétérogénéité phénotypique de la population du biofilm et l'apparition de cellules variantes (Drenkard, 2003; Lewis, 2001; Mah & O'Toole, 2001; Stewart, 2002). Ces mécanismes de tolérance sont détaillés dans cette section.

### 1. Limitation de la diffusion

La matrice extracellulaire exerce un rôle protecteur pour les cellules du biofilm en limitant la diffusion des composés toxiques par sorption ou réaction chimique (Stewart, 1998). En effet, elle est composée d'acides nucléiques, de protéines et de sucres et présente par conséquent des groupements fonctionnels chargés, à savoir carboxylates ( $\text{R-COO}^-$ ), phosphates ( $\text{R-HPO}_4^-$ ), sulfhydryles ( $\text{R-SH}$ ), amines ( $\text{R-NH}_3^+$ ), phénoliques ( $\text{R-C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) et hydroxyles ( $\text{R-OH}$ ) (Harrison *et al.*, 2007). En fonction de leur nature chimique, la diffusion des composés toxiques est affectée différemment. La pénétration des aminoglycosides, qui sont des antibiotiques polycationiques, est par exemple fortement ralentie dans un biofilm de *P. aeruginosa* alors que les fluoroquinolones, chargées négativement, diffusent librement (Shigeta *et al.*, 1997). De la même manière, la diffusion des ions métalliques est fortement ralenti car ces derniers sont séquestrés dans la matrice (Diels *et al.*, 2009). Les groupements fonctionnels de cette dernière peuvent aussi directement réagir avec les composés toxiques et modifier leur réactivité (Harrison *et al.*, 2005).

D'autre part, de nombreux produits métaboliques et enzymes sont présents dans la matrice extracellulaire et peuvent réagir avec les composés toxiques. Les sulfites ( $S^{2-}$ ), produits dans les biofilms d'organismes sulfato-réducteurs, co-précipitent par exemple avec les métaux lourds (Beyenal & Lewandowski, 2004; Beyenal *et al.*, 2004). Les métaux co-précipitent aussi avec les carbonates ( $HCO_3^-$  et  $CO_3^{2-}$ ) produits durant la respiration microbienne (Dupraz & Visscher, 2005).

Cependant, la matrice extracellulaire ne fait que limiter la pénétration des composés toxiques et lors d'une exposition longue à un composé bactéricide, lorsque tous les sites de fixation de la matrice sont saturés, ce mécanisme de défense est insuffisant, et d'autres mécanismes prennent le relai.

## 2. Phénotype spécifique du biofilm régulé par le quorum-sensing

### a. Phénotype spécifique du « biofilm »

Le développement d'un biofilm est associé à des changements physiologiques de l'ensemble des cellules. Ces changements physiologiques pourraient expliquer une partie de la forte résistance aux composés antibactériens d'un biofilm (Drenkard, 2003). Les adaptations physiologiques apparaissent après l'attachement des cellules à la surface et durant toute la croissance du biofilm et concernent la production d'exopolysaccharides, la morphologie des cellules et la synthèse des organelles de surface (Stewart & Franklin, 2008). Jusqu'à 50% du contenu protéique varient entre des cellules d'un biofilm mature et des cellules planctoniques. En particulier, les cellules d'un biofilm synthétisent de manière accrue les protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif, la production d'exopolysaccharides, le métabolisme carboné et les pompes d'efflux multi-drogues (Maira-Litran *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002). En raison de la faible diffusion des composés toxiques dans biofilm, il a été proposé que les cellules y résidant auraient plus de temps pour mettre en place les différents mécanismes de réponse au stress que les cellules vivant à l'état planctonique (Stewart, 2002).

Par ailleurs, les gènes de la réponse générale au stress sont induits dans les cellules d'un biofilm. L'activation de ce mécanisme en phase stationnaire résulte en une augmentation de la résistance aux contraintes environnementales, telles que les carences en nutriments, les dommages à l'ADN et les stress osmotiques et thermiques. Chez *P. aeruginosa*, le facteur RpoS, qui est le régulateur principal de la réponse générale au stress, est surexprimé d'un facteur 3 dans les cellules d'un biofilm par rapport à une culture planctonique en phase stationnaire (Xu *et al.*, 2001). Chez *E. coli*, l'induction de ce facteur résulte en une surproduction de tréhalose, qui a un rôle d'osmoprotecteur, et une surexpression de la catalase (Liu *et al.*, 2000).

Ce phénotype spécifique « biofilm » est, au moins en partie, induit par le système de quorum-sensing. Ce système contrôle entre autres l'expression du facteur RpoS (Drenkard, 2003).

### b. Quorum-sensing

Le quorum-sensing est un terme utilisé pour décrire la signalisation intercellulaire des bactéries. L'expression des gènes est en effet souvent régulée par de petites molécules sécrétées par les cellules dans le milieu environnant. Lorsque ces molécules signal sont retrouvées à une concentration témoignant d'un quorum – ou densité cellulaire critique –, elles induisent des mécanismes nécessitant des activités coordonnées d'un grand nombre d'individus. En fonction de la densité cellulaire et des bénéfices que cela apporte à la population, le quorum-sensing induit soit la formation du biofilm soit sa dispersion (Parsek & Greenberg, 2005). Les paramètres physico-chimiques du milieu extérieur (pH, température etc.) déterminent la stabilité de la molécule signal (Kirisits & Parsek, 2006).

Le système de quorum-sensing des bactéries Gram positives utilise des oligopeptides autoinducteurs. La détection du signal est réalisée par des histidines kinases. Celles-ci vont transmettre le signal en phosphorylant un système de régulation à deux composants. La phosphorylation de ce dernier modifie son activité de liaison à l'ADN et ainsi la régulation des gènes cibles. Le système de quorum-sensing des bactéries Gram négatives est centré sur l'acyl-homosérine lactone (acyl-HSL). Une enzyme (de la famille de LuxI) est responsable de

la synthèse d'acyl-HSL et un récepteur cytoplasmique (de la famille de LuxR) perçoit le signal lorsque ce dernier atteint une concentration critique (Henke & Bassler, 2004).

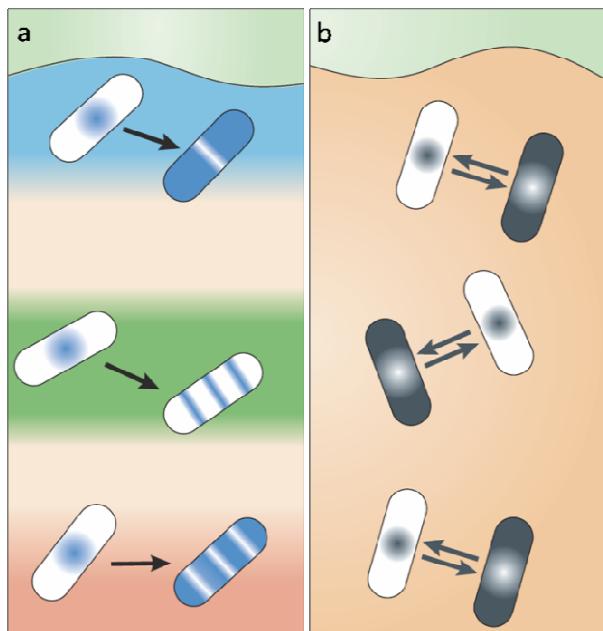
Toutefois, l'induction de la réponse générale au stress par le quorum-sensing ne suffit pas à expliquer l'hyper-résistance aux stress environnementaux des cellules d'un biofilm. La forte hétérogénéité phénotypique et génétique de la population d'un biofilm joue un rôle crucial dans la stabilité de la communauté dans le temps (McCann, 2000). Les mécanismes générant ces deux types d'hétérogénéité ainsi que leur implication dans la résistance des biofilms sont décrits ci-dessous.

### 3. Hétérogénéité phénotypique

L'hétérogénéité phénotypique d'une population bactérienne clonale est cruciale pour sa survie sous des pressions de sélection fluctuantes. Cette diversité, non liée à des modifications génétiques, permet à une fraction de la population de résister à un stress éradiquant le reste des individus et de recoloniser le milieu après la levée de la pression. La résistance au stress, transitoire car non transmise aux générations suivantes, est considérée comme une « tolérance phénotypique » (Dhar & McKinney, 2007). L'hétérogénéité phénotypique existe dans toutes les populations bactériennes clonales, mais est généralement masquée par les approches classiques de culture. Elle peut être étudiée grâce aux techniques de cytométrie de flux et de microfluidique qui permettent de caractériser chaque individu d'une population (Lu *et al.*, 2007).

L'organisation spatiale et les variations de densité cellulaire d'un biofilm entraînent la mise en place de gradients chimiques – en nutriments, oxygène, déchets métaboliques ou encore facteurs de signalisation – conduisant à la formation de microenvironnements. Ceux-ci favorisent l'augmentation de la diversité physiologique de la population (Stewart & Franklin, 2008; Wimpenny *et al.*, 2000). Cette hétérogénéité peut être spatialement organisée en sous-populations de cellules présentant des activités métaboliques différentes en fonction des gradients chimiques. Elle peut aussi être aléatoirement répartie dans le biofilm car liée au caractère stochastique des réactions chimiques cellulaires, et en

particulier de l'expression des gènes. Ces deux mécanismes sont représentés dans la figure 1 et sont détaillés ci-dessous.



**Figure 1.** Mécanismes générant de la diversité phénotypique au sein d'un biofilm. **a.** Différenciation physiologique des cellules en réponse aux contraintes locales. L'expression des gènes des cellules peut par exemple être influencée par la concentration en oxygène, le pH et la disponibilité des nutriments. **b.** Transition aléatoire entre deux phénotypes (bistabilité) (d'après Stewart and Franklin, 2008).

### a. Hétérogénéité physiologique spatialement organisée

En fonction de leur localisation dans le biofilm et des gradients chimiques, les cellules se répartissent en sous-populations présentant des activités métaboliques différentes. Les cellules à la périphérie du biofilm ont par exemple davantage accès aux nutriments et à l'oxygène que celles du centre qui présentent par conséquent des activités métaboliques très faibles (Xu *et al.*, 1998). En raison de cette hétérogénéité métabolique, la sensibilité des cellules à un composé毒ique diffère en fonction de leur localisation au sein du biofilm. Ainsi, si la résistance à un composé毒ique donné nécessite une réponse active de la cellule (synthèse d'enzyme par exemple), les sous-populations de cellules au centre des microcolonies y seront plus sensibles (Pamp *et al.*, 2008). À l'inverse, certains composés bactéricides n'ont d'effet que sur les cellules métaboliquement actives (Walters *et al.*, 2003).

Chez *P. aeruginosa*, les cellules à croissance lente présentent une sensibilité moindre à la tétracycline mais identique vis-à-vis de la tobramycine à celle des cellules en phase de croissance (Brooun *et al.*, 2000; Spoering & Lewis, 2001). Par ailleurs, la colistine (peptide antimicrobien) est plus毒ique pour la population faiblement active car le mécanisme de défense à la colistine nécessite une réponse énergétique de la part des cellules (Pamp *et al.*, 2008).

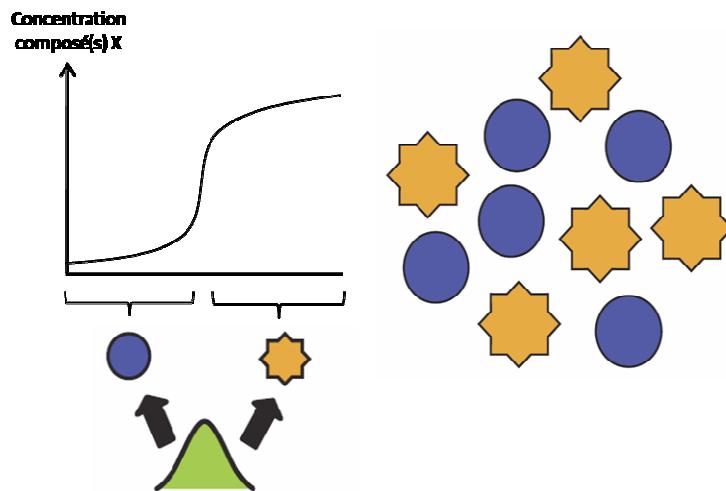
Cependant, il a aussi été proposé que les gradients chimiques eux-mêmes affectent l'action des antibiotiques et sont responsable de la réponse hétérogène du biofilm à un stress. Ainsi, la concentration en oxygène module l'action des aminoglycosides (Tack & Sabath, 1985) et de la même manière le pH joue sur l'efficacité des antibiotiques (Retsema *et al.*, 1991).

### b. Hétérogénéité phénotypique liée à l'expression aléatoire des gènes

Différents facteurs, à savoir la nature aléatoire des réactions chimiques cellulaires, les différences au niveau de l'état interne des cellules (cycle cellulaire, répartition des protéines durant la division cellulaire etc.) et les micro-hétérogénéités de l'environnement, entraînent une expression aléatoire des gènes. Celle-ci génère une diversité phénotypique au sein d'une population clonale, indépendamment des conditions environnementales globales. Ainsi, deux cellules voisines et génétiquement identiques peuvent avoir des activités métaboliques différentes (Elowitz *et al.*, 2002; Raser & O'Shea, 2005). Dans un biofilm, la forte densité cellulaire et les nombreux gradients chimiques accentuent ces phénomènes, et plus particulièrement ceux de multistabilité, dont la transition de certaines cellules en cellules persistantes est un exemple.

#### i. Multistabilité

La multistabilité est l'existence simultanée de deux ou plusieurs phénotypes stables dans une population clonale (Dubnau & Losick, 2006; Veening *et al.*, 2008). La bistabilité par exemple correspond à une répartition bimodale de la population. De très faibles fluctuations de concentration d'un composé donné, appuyées par des boucles de rétrocontrôle négatif, entraînent la transition d'un état à un autre (Figure 2) (Raser & O'Shea, 2005).



**Figure 2.** Etat bistable d'une population cellulaire. Les cellules oscillent de manière égale entre deux phénotypes en fonction de la concentration d'un composé donné. Une faible différence de concentration entraîne la transition (d'après Raser and O'Shea, 2005).

La population d'un biofilm peut être en état de bistabilité par rapport à plusieurs phénotypes. Chez *B. subtilis* par exemple, la production de la matrice extracellulaire fait l'objet d'une régulation bistable aléatoire. La synthèse est induite par une protéine SinI et réprimée par SinR. En utilisant différents gènes rapporteurs, il a été montré que SinR est exprimé dans toutes les cellules alors que SinI ne l'est que dans certaines. Quand SinI est exprimé, la production de la matrice est induite (Chai *et al.*, 2008).

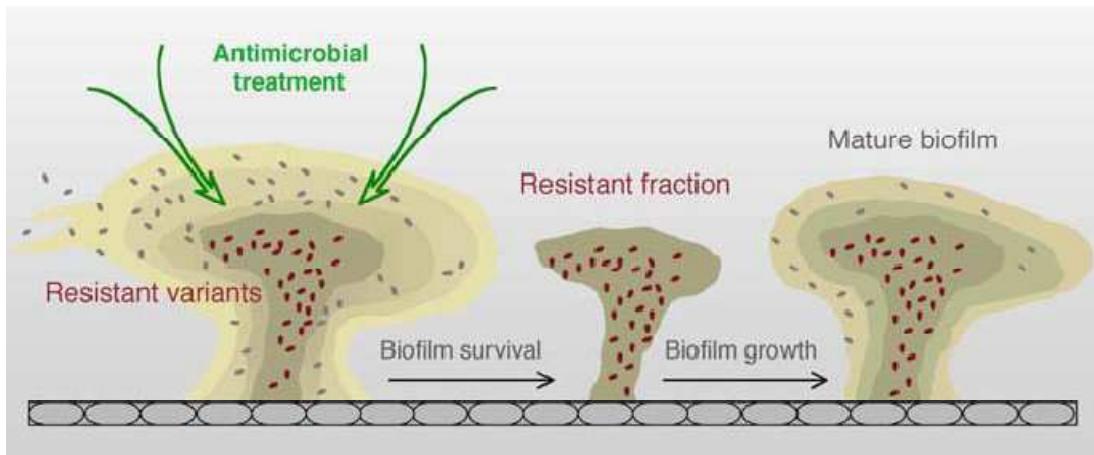
La notion de bistabilité pourrait par ailleurs expliquer l'existence des cellules persistantes qui sont des cellules en état de dormance présentant une résistance accrue aux composés toxiques. Par des techniques de microfluidique, il a été démontré que la transition à cet état se fait aléatoirement au sein d'une population clonale et indépendamment des conditions environnementales (Balaban *et al.*, 2004).

### ii. Cellules persistantes

Lorsqu'une culture clonale est exposée à un stress, la majorité de la population est tuée par des concentrations faibles en composé antibactérien alors qu'une petite proportion de cellules résiste à des concentrations très fortes (Brooun *et al.*, 2000; Spoering & Lewis, 2001). Cette sous-population est formée de cellules dites persistantes qui ne sont pas des

mutants résistants mais des cellules dans un état de dormance surexprimant des gènes de la réponse générale au stress, de la réponse SOS et conférant une résistance aux chocs thermiques (Dhar & McKinney, 2007). Après exposition à un composé toxique et éradication du reste de la population, elles permettent une recolonisation de l'environnement (Figure 3). La nouvelle population présentera les mêmes caractéristiques génétiques et physiologiques que la population de départ. L'identification des cellules persistantes dans une population clonale peut se faire *via* un gène rapporteur fluorescent placé sous le contrôle d'un promoteur d'un gène ribosomique, la sous-population de cellules faiblement fluorescentes correspondant à la fraction de cellules persistantes (Shah *et al.*, 2006).

Dans un biofilm, la proportion des cellules persistantes correspond à 10 % de la population totale, fraction supérieure à celle d'une population planctonique (0.1 %). Les cellules persistantes sont ainsi considérées comme en partie responsables de la résistance importante aux stress des biofilms (Harrison *et al.*, 2005; Keren *et al.*, 2004; Lewis, 2001). Le maintien d'une fraction de cellules persistantes dans la population bactérienne a un coût sur son taux de croissance. Mais cet inconvénient est largement contrebalancé par le bénéfice sur la survie de l'espèce que leur présence confère (Dhar & McKinney, 2007).



**Figure 3.** Mécanisme de résistance lié aux cellules persistantes. Un traitement antibactérien entraîne la mort de la majorité de la population. La fraction de cellules persistantes qui a survécu au stress reforme ensuite un biofilm aux propriétés équivalentes (Drenkard, 2003).

La transition à l'état de cellule persistante semble être gouvernée par un système toxine-antitoxine (Shah *et al.*, 2006). Cet opéron de deux gènes code une antitoxine instable

et une toxine stable qui peut être neutralisée en formant un complexe avec l'antitoxine. L'antitoxine rétrocontrôle négativement l'opéron (Gerdes *et al.*, 2005). Il a été proposé que lorsque le ratio toxine/antitoxine dépasse un seuil critique, l'augmentation en toxine libre entraîne un arrêt transitoire de la croissance et ainsi l'entrée en état de persistance. Cette hypothèse est soutenue par le fait que chez *E. coli*, une surexpression du gène codant la toxine dans l'opéron toxine-antitoxine *hip* (pour *high-level persistence*) augmente la proportion de cellules persistantes de la population (Dhar & McKinney, 2007; Lewis, 2001). Selon cette théorie, le passage d'une cellule à un état de persistance correspondrait à une transition bistable en fonction de la concentration en toxine.

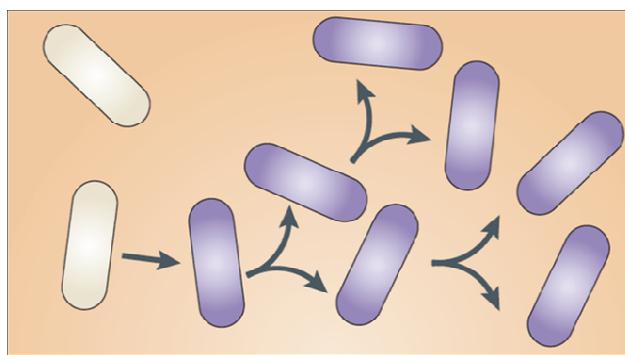
Par ailleurs, une autre hypothèse a été proposée pour expliquer la résistance des cellules persistantes et les phénomènes de mort cellulaire observés dans les biofilms. Selon cette hypothèse, les agents antibactériens ne sont pas directement responsables de la mort cellulaire mais causent des dommages cellulaires qui induisent un mécanisme de mort cellulaire programmée. Seule une proportion de cellules ayant un mécanisme de mort cellulaire défectueux survit à ce stress : il s'agit de la fraction de cellules persistantes (Lewis, 2001).

L'hétérogénéité physiologique d'une population lui permet uniquement de survivre à un stress. Après dispersion du biofilm, les cellules sont à nouveau sensibles. Cette réversibilité indique que les mécanismes sont adaptatifs plutôt que liés à des modifications génétiques. Le biofilm est cependant un espace favorable à l'apparition de mutants résistants capables de se développer normalement en présence de stress (Drenkard & Ausubel, 2002). Accroître sa diversité génétique est un moyen pour une population de se garantir une possibilité de survie si les conditions environnementales deviennent plus hostiles (Boles *et al.*, 2004).

## 4. Hétérogénéité génétique

Durant le développement d'un biofilm, des cellules mutantes (ou variantes) peuvent émerger. Elles se caractérisent par la morphologie des colonies qu'elles forment sur milieu

solide. Leur phénotype est stable après plusieurs repiquages. Les variations sont liées à des délétions, mutations ou des polymorphismes d'un nucléotide simple dans divers gènes, le plus souvent codant la synthèse de polysaccharides, mais aussi de mobilité ou de résistance aux stress (Allegrucci & Sauer, 2007; Boles *et al.*, 2004; Kirisits *et al.*, 2005). La proportion de cellules variantes augmente au cours du développement du biofilm en raison des multiples pressions de sélection qui s'exercent dans les divers microenvironnements des biofilms (Figure 4). La population hétérogène issue du biofilm est plus à même d'affronter les stress (Boles & Singh, 2008; Drenkard & Ausubel, 2002).



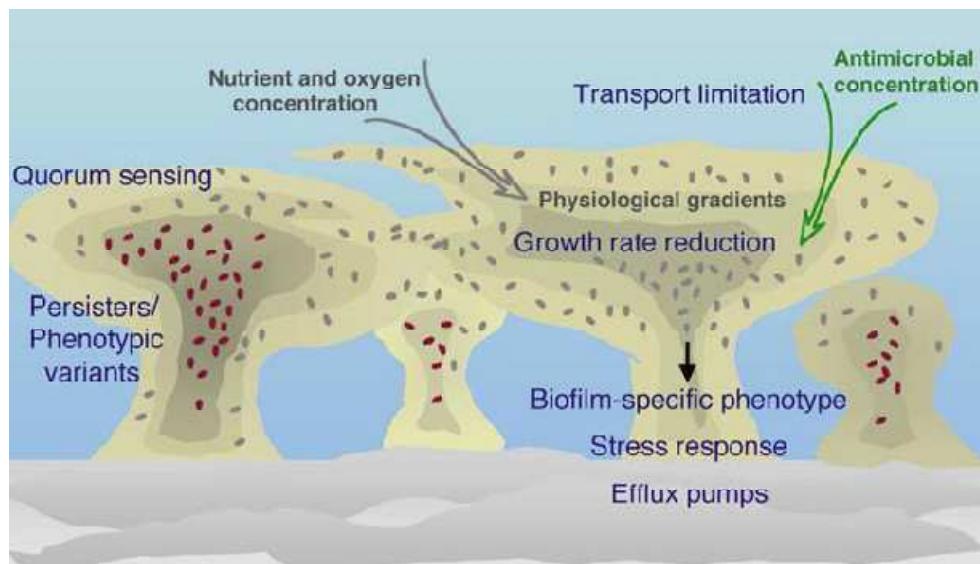
**Figure 4.** Apparition d'une cellule mutante dont la proportion dans la population augmente sous l'action de pressions de sélection (d'après Stewart and Franklin, 2008).

L'apparition de cellules mutantes est expliquée par deux mécanismes. Le premier est l'augmentation des échanges géniques entre les cellules du biofilm liée à l'importante densité cellulaire par conjugaison (Hausner & Wuertz, 1999; Sorensen *et al.*, 2005) ou par l'action de phages (Webb *et al.*, 2003). Le deuxième mécanisme fait intervenir les systèmes de réparation de l'ADN. En effet, il a été observé chez *P. aeruginosa* que les dommages à l'ADN, causés par le stress oxydatif endogène lié à l'activité respiratoire, sont éliminés par le système de réparation des cassures d'ADN double brin (« double-stranded DNA break repair »). Ce mécanisme de réparation a des conséquences mutagènes (Ponder *et al.*, 2005) et son inactivation empêche l'apparition des variants (Boles & Singh, 2008). Par ailleurs, les biofilms de *P. aeruginosa* comprennent souvent des cellules hyper-mutantes. Ces cellules sont affectées au niveau de leur système de réparation des mésappariements de l'ADN (« mismatch repair system ») (Oliver *et al.*, 2000).

La présence de ces mutants confère au biofilm une multi-résistance aux antibiotiques (Macia *et al.*, 2005). De plus, l'action de ces mécanismes de mutation combinée aux multiples pressions de sélection qui s'exercent dans un biofilm entraîne une augmentation rapide de la diversité. Les biofilms représentent ainsi des points chauds de création de diversité.

## 5. Conclusion

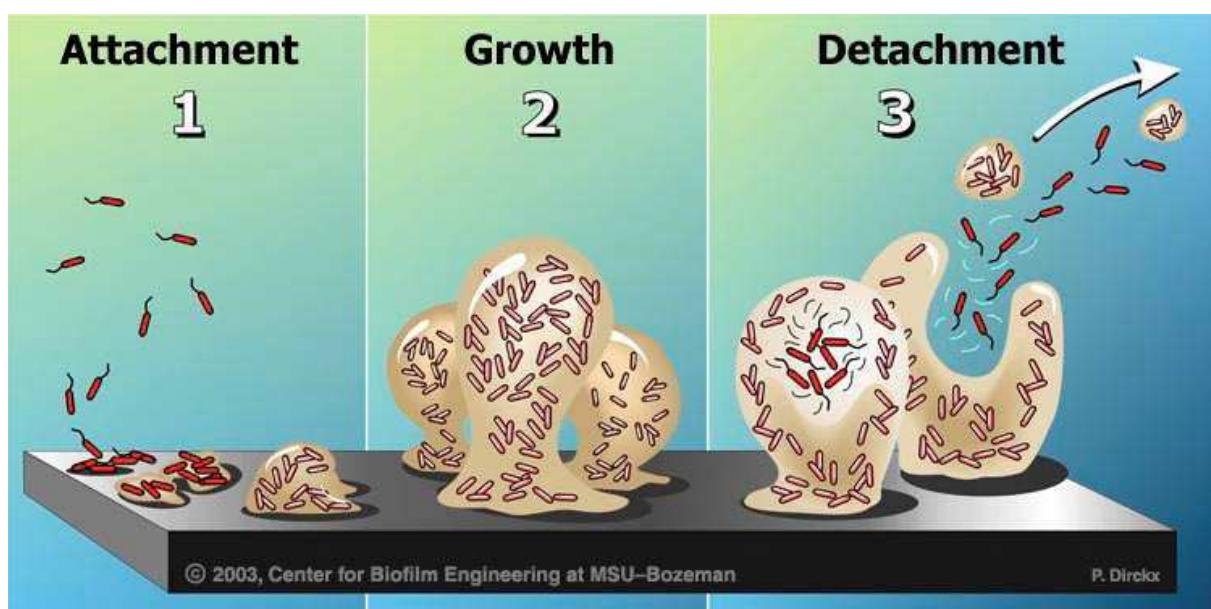
La résistance d'un biofilm est un processus multifactoriel (Figure 5) basé sur des mécanismes de défense innés, liés à la structure et la physiologie du biofilm (limitation de la diffusion, hétérogénéité de l'environnement), et des mécanismes acquis, résultant de l'action du stress (induction de la réponse au stress etc.) (Anderson & O'Toole, 2008).



**Figure 5.** Les différents mécanismes impliqués dans la résistance des biofilms. Les niveaux de brun sont proportionnels à la densité cellulaire et déterminent les gradients de concentrations en nutriments et oxygène. La résistance des biofilms est basée sur la limitation de la diffusion des composés toxiques, l'hétérogénéité métabolique des cellules, l'apparition de cellules variantes, la mise en place d'un phénotype spécifique au biofilm et l'activation de la réponse générale au stress (Drenkard, 2003).

## B. Cinétique de développement d'un biofilm

La formation d'un biofilm bactérien peut être découpée en trois étapes (Figure 6) (Stoodley *et al.*, 2002) : l'initiation correspondant à l'adhésion des cellules sur la surface, la maturation, c'est-à-dire le développement de structures complexes organisées spatialement, et le détachement soit de cellules individuelles, soit de portions entières de la communauté.



**Figure 6.** Développement en trois phases d'un biofilm bactérien (MSU Center for Biofilm Engineering).

Ces étapes sont influencées par les conditions environnementales comprenant la disponibilité des nutriments (excès ou carence) et les différents stress physico-chimiques (pH, température, présence de composés bactéricides etc.). La régulation s'effectue sur des fonctions clés de la formation du biofilm, à savoir l'expression des différentes formes de mobilité, la synthèse d'éléments extracellulaires et de manière plus générale sur l'état physiologique des cellules, les cellules présentant un état physiologique distinct à chaque stade du développement. En moyenne, 35% de l'expression protéique diffèrent entre chaque étape (Sauer *et al.*, 2002). Les trois grandes étapes de développement d'un biofilm et le rôle des structures et propriétés extracellulaires sont détaillés dans cette section.

## I. Initiation du biofilm

L'étape d'initiation du biofilm nécessite le passage de la cellule d'un état planctonique à un état sessile et va s'effectuer en réponse aux facteurs environnementaux (O'Toole *et al.*, 2000). La régulation de la mobilité joue un rôle principal dans cette transition. L'adhésion à un support implique quant à elle les structures et propriétés de la surface cellulaire.

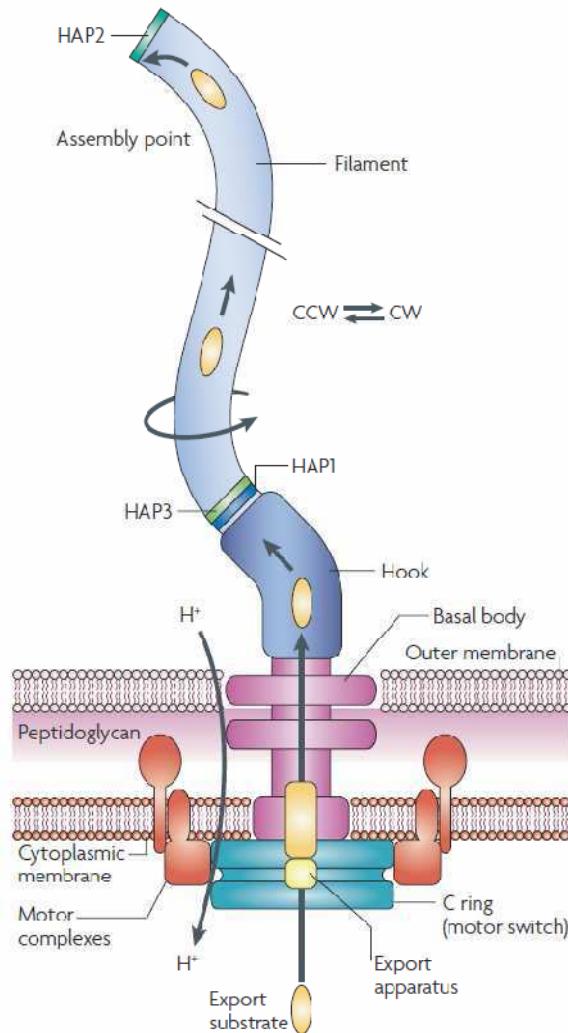
### 1. Transition entre les états planctoniques et sessiles

#### a. Rôle de la mobilité flagellaire et du chimiotactisme dans l'initiation du biofilm

La mobilité d'une cellule lui permet de coloniser des milieux en fonction des conditions environnementales (Harshey, 2003). Les procaryotes ont développé différents moyens de se déplacer, faisant intervenir, entre autres, les flagelles. La mobilité flagellaire joue par ailleurs un rôle essentiel dans l'initiation de la plupart des biofilms (Verstraeten *et al.*, 2008) permettant entre autres de surmonter les forces de répulsion existant entre la cellule et la surface à coloniser (Lemon *et al.*, 2007; O'Toole & Kolter, 1998a; Pratt & Kolter, 1998). La mobilité flagellaire peut aussi contribuer à l'adhésion cellulaire en augmentant la probabilité de contact entre la cellule et la surface (O'Neil & Marquis, 2006).

La **mobilité flagellaire** est le mode de locomotion le plus fréquent et est utilisé par de nombreux organismes bactériens pour nager en milieu liquide (« swimming ») et pour se déplacer sur les surfaces solides (« swarming »). Un flagelle est constitué de trois sous-structures : le corps basal (traversant les membranes et la paroi et contenant le moteur), le filament flagellaire (constitué de flagelline) et le crochet (qui émerge de la cellule et qui relie le filament au corps basal). Le corps basal fonctionne grâce à la force proton-motrice ou à des pompes à sodium et entraîne la rotation du crochet et donc du filament ce qui propulse la cellule (Figure 7) (Jarrell & McBride, 2008; Meister *et al.*, 1987). En milieu liquide, les

flagelles permettent ainsi à une cellule d'avancer de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$  par seconde (Meister *et al.*, 1987).



**Figure 7.** Représentation schématique d'un flagelle d'une bactérie Gram négative (Jarrell & McBride, 2008) composé de trois parties : le corps basal formé des différents anneaux et du moteur, le crochet (« hook ») rigide, et le filament flagellaire. La force proton-motrice permet la rotation du moteur qui entraîne celle du crochet et par conséquent du filament. La rotation peut se faire dans le sens des aiguilles d'une montre (CW) et inversement (CCW).

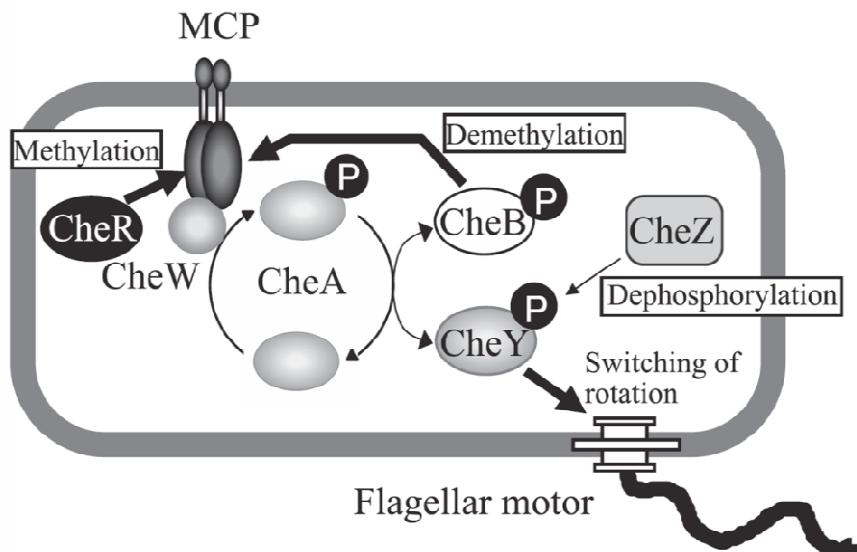
Le « swimming » est généralement testé en milieu liquide, voire en milieu semi-solide contenant 0.3% d'agar. Le « swarming » est lui observé en milieu semi-solide composé de 0.5 à 2% d'agar. Lors du « swimming » sur milieu semi-solide, la bactérie est capable de nager dans la gélose à travers les canaux d'eau. En mode « swarming », la cellule reste à la surface de l'agar et affiche un nombre de flagelles plus important afin de faire face à l'augmentation de la viscosité du milieu et du stress de torsion généré (Belas & Suvanasuthi,

2005; Harshey & Matsuyama, 1994; Jarrell & McBride, 2008). Le nombre de flagelles peut être régulé par le taux d'humidité de la surface (Wang *et al.*, 2004).

Les bactéries mobiles sont capables de ressentir les variations de concentration des composés chimiques de leur environnement et d'y répondre. Le **chimiotactisme** est l'ensemble des mouvements flagellaires d'une cellule dépendants d'un gradient de concentration d'une molécule donnée. Cette concentration, détectée au niveau de récepteurs chimiotactiques, va jouer sur le sens de rotation du moteur du flagelle. Une rotation dans le sens inverse des aiguilles d'une montre entraîne une nage continue (phase de course) alors qu'une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre est associée à un mouvement irrégulier entraînant un déplacement net très faible (phase de culbute) (Figure 8). En présence du ligand, les périodes de course sont plus longues et le déplacement net de la cellule est plus important. Le chimiotactisme peut être positif (substances d'intérêts jouant un rôle énergétique par exemple) ou négatif (substances toxiques) (Baker *et al.*, 2006). Il peut favoriser l'initiation d'un biofilm en permettant la réunion d'un nombre important de cellules (un quorum) et ainsi les phénomènes de quorum-sensing (Park *et al.*, 2003).

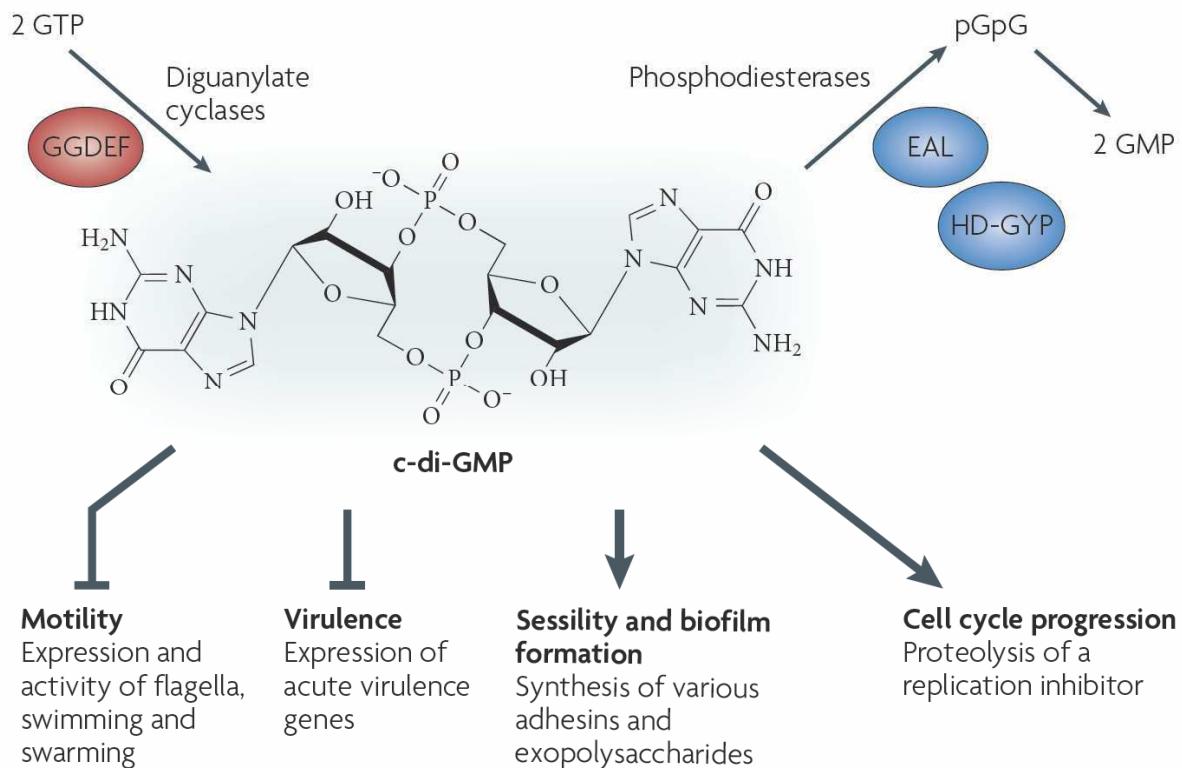
### b. Rôle du monophosphate cyclique di-guanilique (c-di-GMP)

La décision de se fixer sur une surface et de former une communauté structurée est un choix important pour la survie d'une population bactérienne. Cette décision se fait en réponse aux conditions environnementales. La production de flagelles et la synthèse d'exopolysaccharides étant des procédés mutuellement exclusifs, la transition entre les états planctonique et sessile nécessite des changements physiologiques (Kolter & Greenberg, 2006). Le monophosphate cyclique di-guanilique (c-di-GMP) est un messager intracellulaire qui joue un rôle clé dans cette transition. En effet, il fonctionne comme un messager secondaire en réponse à des signaux extracellulaires et régule les comportements multicellulaires, la mobilité et la virulence de nombreuses espèces bactériennes (Barraud *et al.*, 2009; Christen *et al.*, 2007; Jonas *et al.*, 2010; Pratt *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2009).



**Figure 8.** Le système de chimiotactisme de *P. aeruginosa*. Les récepteurs chimiotactiques sont des Methyl-accepting Chemotaxis Proteins (MCPs) qui traversent la membrane et sont associés à des histidines kinases (CheA) par l'intermédiaire de CheW, une protéine de couplage. CheY, une protéine effectrice, fait le lien entre le récepteur et le moteur. Lorsque les récepteurs pour une substance donnée sont vides, CheA est phosphorylée et entraîne la phosphorylation de CheY. Cette dernière va alors interagir avec le moteur du flagelle et le faire tourner dans le sens des aiguilles d'une montre, entraînant la culbute. Au contraire, si le chimiorécepteur est lié à son ligand, CheY n'interagit pas avec le moteur du flagelle et la bactérie continue sa course. Pour permettre à la cellule mobile de suivre l'évolution de la concentration extracellulaire de la molécule d'intérêt, une protéine, CheZ, déphosphoryle CheY à vitesse constante. La sensibilité des récepteurs est modulée par leur degré de méthylation : CheR, une méthyltransférase, méthyle les récepteurs à vitesse constante et CheB, une méthylestérase, les déméthyle lorsqu'elle est phosphorylée ce qui a pour conséquence d'augmenter la sensibilité des récepteurs (Kato *et al.*, 2008).

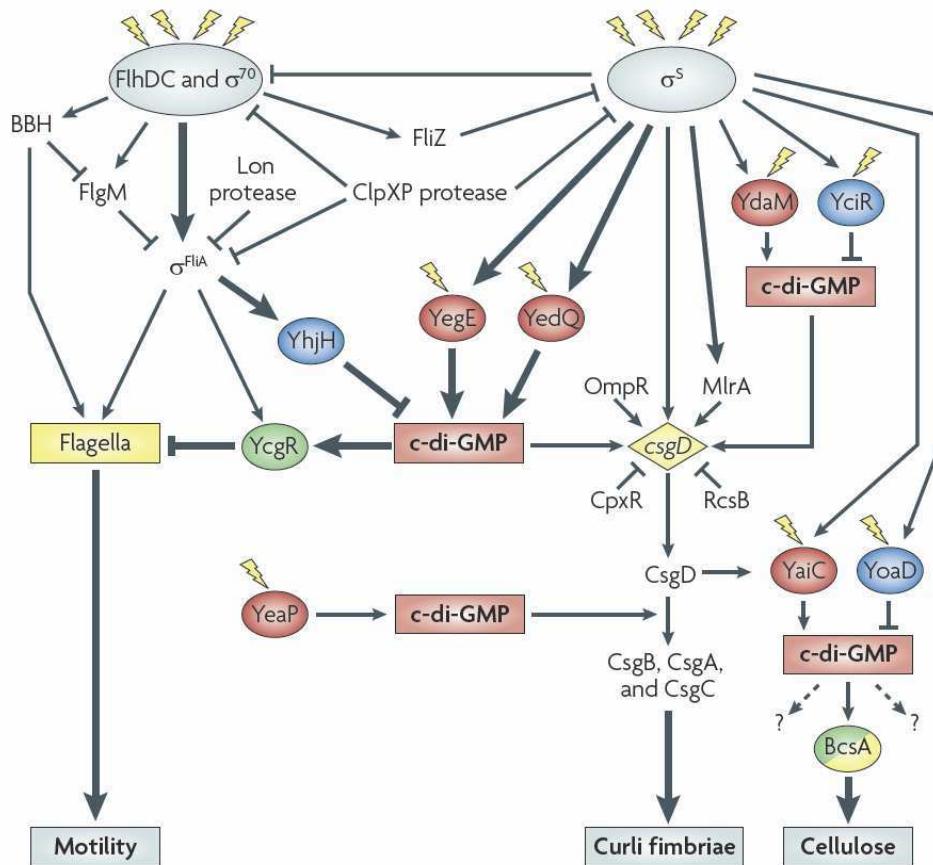
Le c-di-GMP est synthétisé par les diguanylate cyclases (qui possèdent un domaine GGDEF) et est dégradé par des phosphodiesterases spécifiques (présentant des domaines EAL- ou HD-GYP). En général de fortes concentrations en c-di-GMP coïncident avec une augmentation de l'adhésion – liée à une induction de la synthèse des fimbriae et de la capsule – et une réduction de la motilité par diminution de la synthèse et de la rotation du flagelle (Figure 9) (Hengge, 2009; Verstraeten *et al.*, 2008).



**Figure 9.** Structure et rôles dans différentes fonctions physiologiques du c-di-GMP. Des diguanylate cyclases à domaine GGDEF sont impliquées dans sa synthèse et des phosphodiesterases à domaine EAL ou HD-GYP dans sa dégradation. Ce messager secondaire inhibe la mobilité et la virulence des cellules. En parallèle, il induit la formation de biofilm et la multiplication cellulaire (Hengge, 2009).

Le taux de c-di-GMP est régulé par divers facteurs environnementaux, par chimiotactisme ou quorum-sensing. Chez *P. aeruginosa*, des protéines impliquées dans le chimiotactisme répriment la synthèse du c-di-GMP, ce qui a pour conséquence de ralentir la formation du biofilm (Hickman *et al.*, 2005). Pour les souches du genre *E. coli*, un modèle de régulation de la concentration intracellulaire en c-di-GMP a été proposé (Figure 10). Le taux de c-di-GMP est contrôlé négativement par la cascade FlhDC (régulant la mobilité) et positivement par celle de  $\sigma^S$  (régulant l'adhésion). Le régulateur FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> est une protéine liant l'ADN qui est nécessaire, directement ou non, pour l'expression de tous les autres gènes de mobilité et de chimiotactisme. Son expression est liée à différents régulateurs, qui retransmettent les conditions environnementales telles que l'osmolarité (H-NS, EnvZ-OmpR), les stress au niveau de l'enveloppe (RcsCDB), les concentrations en nutriments (Crp) ou encore le quorum-sensing (QseBC) (Goller & Romeo, 2008).  $\sigma^S$  ou RpoS est une sous-unité sigma de l'ARN polymérase chez *E. coli* induite en cas de stress. L'ARN polymérase contenant

$\sigma^S$  va induire avec deux autres protéines (dont YdaM, une protéine à domaine GGDEF) la synthèse de la protéine CsgD, qui est un activateur essentiel des gènes de synthèse des curli (Pesavento *et al.*, 2008).



**Figure 10.** Contrôle de la concentration intracellulaire en c-di-GMP chez *E. coli*. Le taux de c-di-GMP qui gouverne la transition entre les états mobile et sessile des cellules est contrôlé négativement par la cascade FlhDC (régulant la mobilité) et positivement par celle de  $\sigma^S$  (régulant l'adhésion cellulaire) (Hengge, 2009).

## 2. Adhésion à la surface

Une fois entamée, la transition de l'état planctonique à l'état sessile va nécessiter des modifications physiologiques importantes qui vont faciliter l'adhésion de la cellule à une surface. Ces modifications concernent la charge et les propriétés d'hydrophobicité de la surface cellulaire ainsi que la synthèse de protéines de la membrane externe (Goulter *et al.*, 2009).

### a. Forces mises en jeu

L'adhésion d'une cellule à une surface est divisée en une étape d'adhésion réversible et une irréversible. L'**attachement réversible** implique des forces « faibles » (liaisons van der Waals, électrostatiques, interactions hydrophobes) entre la cellule et la surface (Strevett & Chen, 2003). A cette étape, les cellules sont facilement détachables, par les forces hydrodynamiques du liquide environnant par exemple. L'étape d'**adhésion irréversible** met en jeu des forces plus importantes, telles que des liaisons hydrogènes, covalentes ou des interactions hydrophobes fortes. La perte des flagelles et la synthèse d'organelles d'adhésion telles que les fimbriae est souvent nécessaire pour la fixation irréversible à proprement parler (Pruss *et al.*, 2006). A ce stade, le décrochage des cellules nécessite des méthodes physiques ou chimiques plus drastiques (Goulter *et al.*, 2009).

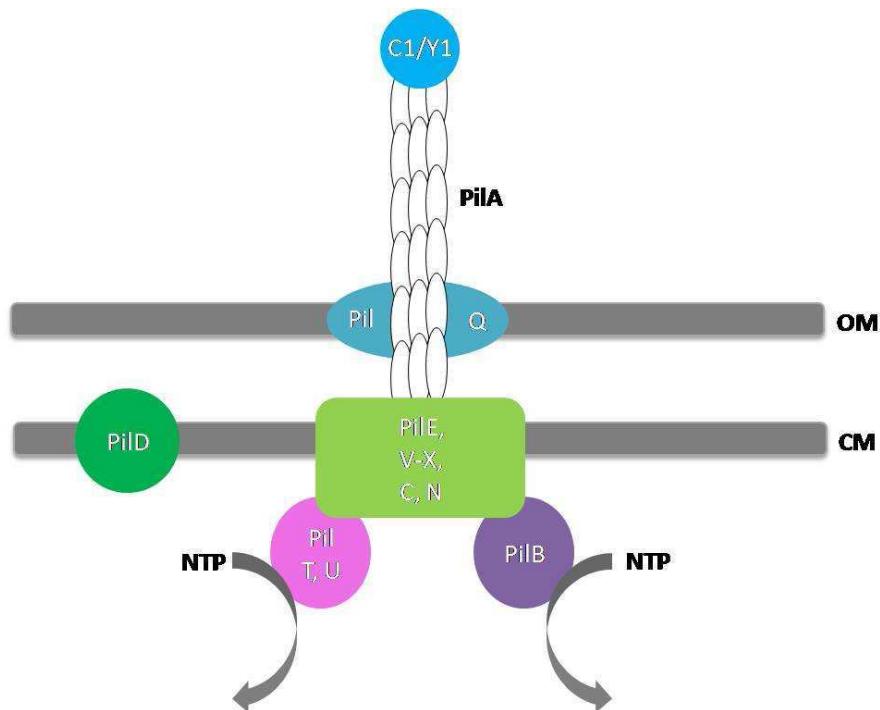
### b. Structures et propriétés impliquées dans l'adhésion

L'attachement d'une cellule à un support est principalement fonction, outre de la nature du support même (qui ne sera pas traitée ici), de la charge et des propriétés hydrophobes de sa surface ainsi que des structures protéiques qui s'y trouvent. Ces fonctions d'adhésion sont régulées par les facteurs environnementaux grâce aux mécanismes de quorum-sensing et au chimiotactisme.

La **charge nette de la surface** est généralement négative en raison des groupes carboxyles ( $-COO^-$ ) et phosphates ( $-PO_4^{2-}$ ) qui se trouvent dans les parois (Goulter *et al.*, 2009). Cette charge est caractérisée par le potentiel zeta (Wilson *et al.*, 2001). Les **propriétés hydrophobes de la surface** cellulaires liées à sa composition varient en fonction des espèces, du stade de croissance et des conditions de culture (Goulter *et al.*, 2009). L'hydrophobicité est généralement estimée sur une population de cellules en mesurant soit l'affinité de la culture pour un solvant (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) soit l'angle de contact entre le tapis de cellules et un liquide (van der Mei *et al.*, 1998). La microscopie à force atomique permet de mesurer les forces d'hydrophobicité à l'échelle de la cellule (Alsteens *et al.*, 2007). Les polysaccharides de la **capsule** peuvent aussi jouer un rôle dans l'adhésion de la cellule soit

en accroissant ses capacités adhésives s'ils sont hydrophobes, soit en les diminuant s'ils sont hydrophiles et masquent des composants hydrophobes de l'enveloppe cellulaire (Goulter *et al.*, 2009).

Les **protéines de la membrane externe**, protéines membranaires ou lipoprotéines, des bactéries Gram négatives représentent environ 50% en masse de la membrane externe. Leur synthèse et leur nature affectent directement les propriétés de la surface cellulaire (Otto & Hermansson, 2004). Les **flagelles** peuvent servir de structures adhésives, indépendamment de leur rotation (Kirov *et al.*, 2004; Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000). Les **fimbriae**, ou pili, participent à l'hydrophobicité de la surface par leur forte proportion en acides aminés hydrophobes (Otto *et al.*, 1999). Les **pili de type IV** sont des fimbriae particuliers retrouvés chez les bactéries Gram négatives et positives et sont impliquées dans l'attachement des bactéries aux surfaces (Figure 11) (Mattick, 2002; Pelicic, 2008).



**Figure 11.** Représentation schématique d'un pili de type IV d'après Bardy *et al.*, 2003. PilA est la piline majeure et possède un domaine N-terminal consensus. PilE et PilV-X sont des protéines piline-like à fonction inconnue mais essentielles à la synthèse du pilus. PilD est une peptidase impliquée dans la maturation des protéines piline-like mais aussi dans la méthylation de PilA. PilQ est une sécrétine permettant au pilus de traverser la membrane externe (OM). PilT, U et B sont des protéines liant les nucléosides triphosphates et fournissent l'énergie nécessaire à la rétraction et l'assemblage du pilus (Bardy *et al.*, 2003).

Les **curli** sont également un type de fimbriae particulier produits par certaines entérobactéries dont *E. coli*. Leur synthèse est accrue en conditions de stress, ce qui a pour conséquence d'augmenter les capacités d'adhésion de cellules (Boyer *et al.*, 2007).

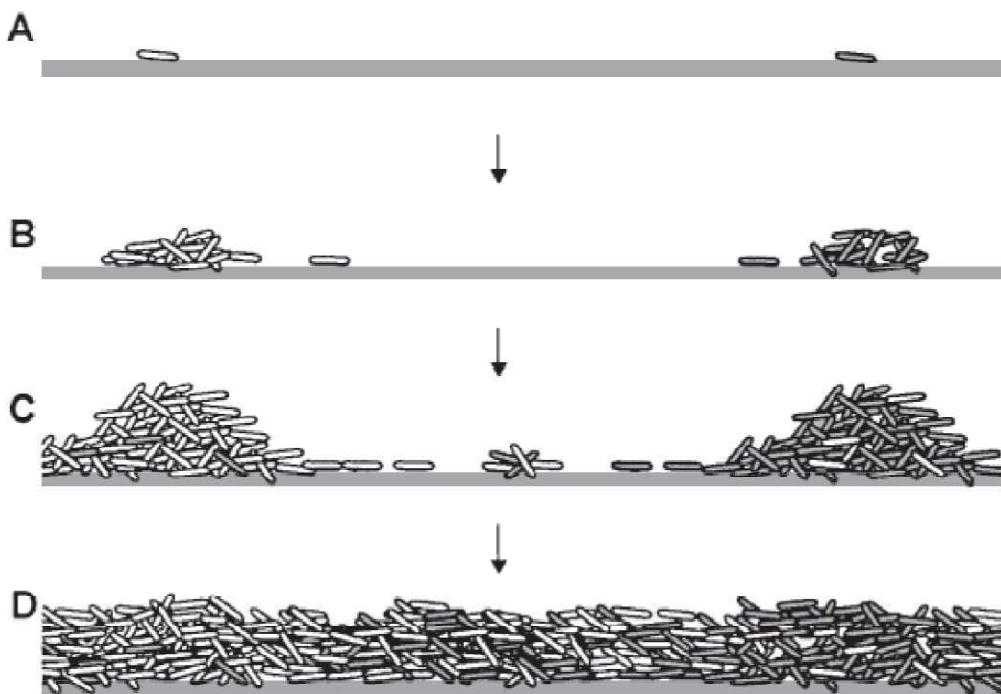
## II. Formation et maturation des structures

Après leur adhésion à une surface, les cellules vont s'agréger pour former des microcolonies. La synthèse d'exopolymères permet ensuite le développement de structures spatialement organisées plus ou moins complexes. Lors de la maturation du biofilm, les événements de mort et lyse cellulaires localisés sont fréquents et font partie intégrante de son développement. Un biofilm mature peut présenter des architectures et propriétés physico-chimiques variables. L'hétérogénéité des structures favorise la différenciation phénotypique et/ou génétique des cellules (Stewart & Franklin, 2008).

### 1. Formation des microcolonies

Après leur attachement irréversible sur une surface, les cellules forment des zones de forte densité cellulaire, les microcolonies. Trois mécanismes permettant la mise en place de ces agrégats cellulaires ont été proposés. Le premier n'impliquant aucune forme de mobilité est la **réPLICATION CLONALE** des cellules ayant adhéré irréversiblement à la surface (Klausen *et al.*, 2003). Le deuxième mécanisme est basé sur le « **twitching** », mouvement de translocation de surface lié aux pili. Il permet le déplacement des cellules le long de la surface et ainsi leur regroupement en microcolonies (O'Toole & Kolter, 1998b). Le troisième mécanisme de formation de microcolonies est basé sur le **recrutement de cellules planctoniques** au fur et à mesure du développement du biofilm (Lemon *et al.*, 2007; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). L'implication relative de ces trois mécanismes dépend de la nature de l'organisme, de la surface à coloniser et des conditions physico-chimiques (Stoodley *et al.*, 2002).

Un modèle de formation des microcolonies a été proposé pour *P. aeruginosa*. Les microcolonies sont initiées par réPLICATION CLONALE. Les structures sont ensuite élargies grâce au « twitching », qui permet à la souche de coloniser l'intégralité de la surface (Figure 12) (Klausen *et al.*, 2003). La mobilité flagellaire assure ensuite le développement tridimensionnel des structures (Barken *et al.*, 2008).



**Figure 12.** Formation de microcolonies chez *P. aeruginosa*. Les cellules irréversiblement attachées à la surface (A) se divisent pour former des microcolonies (B). Grâce aux pili de type IV, certaines cellules vont agrandir la base des microcolonies (C) jusqu'à recouvrement total de la surface (D) (Klausen *et al.*, 2003).

## 2. Différenciation du biofilm et interactions entre les cellules

La morphologie des biofilms matures est très variable, allant de la simple couche de cellules à des architectures extrêmement complexes. Lors de la mise en place des structures tridimensionnelles, les cellules subissent des différenciations physiologiques, notamment au niveau de leur activité de synthèse des exopolymères, qui sont régulées par le quorum-sensing. L'organisation tridimensionnelle des structures favorise ensuite la communication et la coopération entre les cellules.

### a. Caractéristiques de la population d'un biofilm mature

La régulation des gènes et le profil protéique diffèrent fortement entre des cellules d'un biofilm mature et celles d'une culture planctonique (Stoodley *et al.*, 2002). Tout d'abord, les gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides sont induits dans les cellules d'un biofilm, les exopolysaccharides assurant la cohésion et le maintien des structures. Par ailleurs, la biosynthèse des phospholipides et des lipopolysaccharides et le transport et la sécrétion membranaires sont accentués assurant la synthèse de la matrice extracellulaire. D'autre part, des variations dans l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique ont été observées (Sauer *et al.*, 2002). Cela est lié au fait que beaucoup de cellules du biofilm modifient leurs processus physiologiques, passant par exemple d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie, en réponse à la niche particulière qu'elles occupent au sein du biofilm (Stewart & Franklin, 2008). Enfin, des mécanismes d'adaptation et de défense, tels que la réponse générale au stress régulée par le facteur RpoS (voir section **A. Définition et résistance au sein des biofilms bactériens**), sont induits dans le biofilm mature (Sauer *et al.*, 2002).

### b. Rôle du quorum-sensing

Lors de la maturation du biofilm, des canaux d'eau sont mis en place. Ceux-ci améliorent d'une part le transfert des nutriments mais facilitent aussi tous les phénomènes de quorum-sensing. Le quorum-sensing joue en effet un rôle capital dans la différenciation du biofilm et la coordination des activités de la communauté (Davies *et al.*, 1998; Nadell *et al.*, 2009; Stoodley *et al.*, 2002). Il intervient par exemple dans l'induction de la synthèse des exopolysaccharides. En effet, il a été démontré que lors du développement du biofilm de *P. aeruginosa* des acyl homosérines lactones induisent une surproduction d'exopolysaccharides (Sakuragi & Kolter, 2007; Stoodley *et al.*, 2002).

### c. Interactions entre les cellules

La forte densité cellulaire d'un biofilm mature favorise les échanges géniques, par l'intermédiaire de phages (Kirov *et al.*, 2007) ou de plasmides (Sorensen *et al.*, 2005). Par

ailleurs, l'organisation structurelle favorise la coopération entre les cellules. Ainsi, dans un biofilm multi-spécifique, l'arrangement des cellules facilite la juxtaposition d'organismes au métabolisme complémentaire. Dans un biofilm mono-spécifique, l'architecture complexe installe des gradients physico-chimiques. Cette hétérogénéité de structure favorise le développement de sous-populations de cellules qui accroissent la diversité de la population (Stewart & Franklin, 2008). Toutefois, la forte densité cellulaire d'un biofilm entraîne également des situations de compétition entre les cellules, pour les nutriments par exemple. Un biofilm est donc le résultat d'un équilibre entre collaboration et conflits (Nadell *et al.*, 2009).

### **3. Evénements de mort et lyse cellulaires localisés**

Un biofilm mature est formé de sous-populations de cellules aux états physiologiques variables car soumises à différentes conditions environnementales. Certaines vont par exemple produire plus d'exopolysaccharides et d'autres entrer en dormance voire mourir et lyser (Stewart & Franklin, 2008). Les événements de mort et lyse cellulaires localisés sont fréquemment observés au cours de l'étape de maturation d'un biofilm. Ils apportent des nutriments au reste de la population, mais aussi de l'ADN, qui est un composant structurel essentiel du biofilm (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Ces événements participent ainsi au développement et à la dispersion du biofilm. La mort et la lyse des cellules sont deux événements indépendants, plus ou moins régulés en fonction des espèces bactériennes. Ils peuvent être le résultat d'une réponse hétérogène d'un biofilm à un stress environnemental, contrôlés par des mécanismes de mort cellulaire programmée ou encore liés à des phénomènes de fratrie.

#### **a. Hétérogénéité physiologique du biofilm**

Un stress environnemental donné n'affecte pas la population d'un biofilm de manière homogène. La réponse des cellules dépend d'une part de leur état physiologique (ex. forte activité métabolique ou dormance). Ainsi, si la défense à un stress donné nécessite une réponse active des cellules, les cellules les moins actives d'un point de vue métabolique

seront plus sensibles (voir section **A. Définition et résistance au sein des biofilms bactériens**) (Pamp *et al.*, 2008). D'autre part, l'effet d'un stress dépend de son intensité, qui n'est pas uniforme au sein d'un biofilm (Stewart & Franklin, 2008). Le stress oxydatif endogène, lié à la présence d'espèces réactives oxygénées telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), est particulièrement important dans les biofilms en raison de la faible croissance des cellules ou de situations de carence, en nutriments ou eau (Imlay, 2003). Ainsi, le stress oxydatif est plus important dans les cellules à proximité du substrat. Lorsque la concentration intracellulaire en espèces réactives oxygénées dépasse la capacité de la cellule à les éliminer, des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides sont engendrés et peuvent conduire à la mort de la cellule (Chang *et al.*, 2009).

Dans les deux cas de figure présentés ici, les événements de mort cellulaire résultent d'une réponse passive de la population microbienne à un stress environnemental. Toutefois, certains événements de mort et lyse cellulaires sont hautement régulés et s'apparentent aux phénomènes de mort cellulaire programmée se déroulant chez les eucaryotes les plus évolués. Ils font intervenir des phages, des protéines autolytiques ou encore l'activité muréine hydrolase des cellules. D'autres sont basés sur des comportements de cannibalisme ou de fratriicide.

### b. Mort et lyse cellulaires programmées

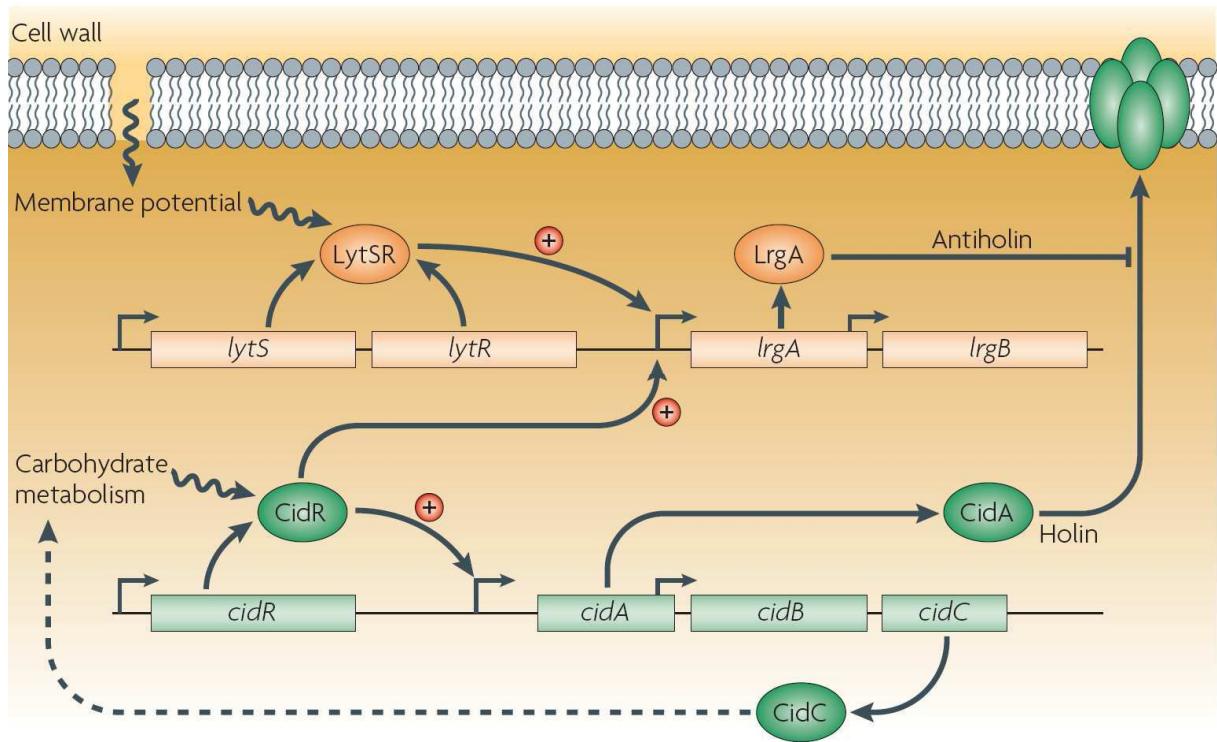
Les phénomènes de mort et lyse cellulaires programmées se déroulant chez les eucaryotes les plus évolués ont pour rôle d'éliminer les cellules endommagées afin que celles-ci ne deviennent pas une menace pour le reste de la population (Bayles, 2007). Il a été proposé qu'un mécanisme similaire pouvait être à l'origine de l'élimination de certaines cellules bactériennes en réponse à des agents antibactériens (Lewis, 2001). Les événements de mort et lyse engendrés touchent la population bactérienne au centre des microcolonies. Ce sont les zones de plus forte densité cellulaire du biofilm, et par conséquent celles où le quorum-sensing, régulant en partie ces mécanismes, est le plus important.

*i. Le système Cid/Lrg*

Le système *Cid/Lrg*, deux opérons codant pour des protéines membranaires de type holine/antiholine, régule les évènements localisés de mort et lyse cellulaires observés dans le biofilm de *S. aureus* et joue ainsi un rôle significatif dans son développement (Rice *et al.*, 2007). La protéine codée par *cidA*, homologue à une holine de phage, induit l'activité des muréines hydrolases de la cellule, qui dégradent le peptidoglycane de la cellule et conduisent à sa lyse. La protéine codée par *lrgA* joue le rôle d'une antiholine, réprimant la lyse cellulaire (Figure 13). Ces gènes sont présents dans le génome de nombreuses bactéries Gram positives et négatives. Leur rôle dans le développement des biofilms semble donc hautement conservé (Bayles, 2007).

*ii. Implication d'un bactériophage*

La mort et la lyse cellulaires localisées au sein d'un biofilm peuvent aussi être la conséquence de l'activation d'un bactériophage. Les gènes des bactériophages, exprimés en condition de stress, sont parmi les groupes de gènes les plus induits dans les biofilms. Chez *P. aeruginosa*, les gènes codant pour un bactériophage filamenteux sont 83 fois plus transcrits dans les cellules d'un biofilm en réponse au quorum-sensing que dans une culture planctonique (Whiteley *et al.*, 2001). L'entrée du phage filamenteux en cycle lytique conduit à la mort et à la lyse des cellules situées au centre des microcolonies du biofilm (Webb *et al.*, 2003). Ces événements influencent fortement le développement subséquent du biofilm, favorisent sa dispersion et augmentent la diversité génétique de la population dispersée (Rice *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2004).



**Figure 13.** Le système de régulation *cid/Irg*. Chez *Staphylococcus aureus*, les gènes *cidA* et *IrgA* codent pour des protéines hydrophobes qui ont un rôle homologue à celui d'une holine et d'une antiholrine de phage, respectivement. CidA induit l'activité des muréines hydrolases, ce qui conduit à la lyse de la cellule, alors que LrgA l'inhibe. Les protéines codées par *cidB* et *IrgB* jouent potentiellement un rôle dans la régulation de la mort cellulaire. La protéine CidR, synthétisée en réponse à un excès de glucose, induit la transcription de l'opéron *cidABC*. Le gène *cidC* code pour une pyruvate oxydase. La protéine LytSR, synthétisée en réponse à une baisse du potentiel de membrane, induit la transcription de l'opéron *IrgAB* (Bayles, 2007).

### iii. Induction d'une protéine autolytique

Une protéine autolytique, AlpP, est responsable des événements de mort et lyse cellulaires affectant les cellules situées au centre des microcolonies dans un biofilm de *Pseudoalteromonas tunicata*. Homologue à une lysine oxydase, cette protéine catalyse la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir de L-Lysine, conduisant à la mort de la cellule (Mai-Prochnow *et al.*, 2004). Le développement du biofilm est fortement affecté par ces événements, qui conduisent à une augmentation de la diversité phénotypique de la population (Mai-Prochnow *et al.*, 2006). Des protéines homologues à AlpP ont été identifiées dans de nombreuses bactéries Gram négatives, pour lesquelles des événements de mort et lyse cellulaires semblables à ceux se produisant chez *P. tunicata* ont été observés (Mai-Prochnow

et al., 2008). Ce mécanisme de mort cellulaire semble donc jouer un rôle conservé dans le développement de biofilms.

### c. Cannibalisme et fraticide

La mort et la lyse d'une partie de la population d'un biofilm peuvent aussi résulter de phénomènes de cannibalisme ou de fraticide. De telles situations ont été observées dans des biofilms de *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis*.

#### i. Cannibalisme

Chez *Bacillus subtilis*, la surfactine, une molécule signal du quorum-sensing, induit la phosphorylation de la protéine régulatrice SpoOA. En fonction de son degré de phosphorylation, celle-ci induit une synthèse accrue d'exopolysaccharides accompagnée par la production de deux toxines (Skf et Sdp). Dans un biofilm, les cellules qui synthétisent les toxines provoquent la mort et la lyse de leurs congénères sensibles. L'augmentation en nutriments qui résulte de ces événements favorise les cellules productrices d'exopolysaccharides et donc le développement du biofilm. L'exposition d'un biofilm de *Bacillus subtilis* à des composés microbiens entraîne une réponse similaire de la population (Lopez et al., 2009). Ce processus de mort cellulaire, apparenté à du cannibalisme et modulant le développement du biofilm, semble donc correspondre à un mécanisme de défense (Engelberg-Kulka et al., 2006).

#### ii. Fraticide

Un mécanisme de mort cellulaire apparenté à un phénomène de fraticide a été décrit chez *Enterococcus faecalis*. Une phéromone induit la co-synthèse d'une gélatinase, enzyme activant une protéine autolytique (AtlA), et d'une protéine d'immunité, une sérine protéase (SprE), qui empêche l'activation de la protéine autolytique. La réponse de la population du biofilm à la phéromone est bimodale ; la sous-population cellulaire qui ne répond pas à la phéromone est lysée, suite à l'activation des protéines AltA par les

gélatinases qui sont sécrétées par l'autre partie de la population. L'ADN libéré lors de la lyse des cellules permet le développement du biofilm (Thomas *et al.*, 2009).

#### d. Conclusion : l'altruisme dans les biofilms

Les mécanismes de mort cellulaire programmée et les situations de fratrie et cannibalisme sont un exemple de comportement « altruiste » se déroulant dans un biofilm. Ils sont régulés par le quorum-sensing. Des cellules mutées dans le système de quorum-sensing profitent des bénéfices du système altruiste. Ces cellules « individualistes » (aussi appelées « tricheuses ») deviennent rapidement dominantes. Lorsque leur proportion dans une communauté est trop importante, le taux de croissance de la population chute (Dunny *et al.*, 2008). La coopération entre les cellules d'un biofilm est donc un élément essentiel au maintien et au développement de la communauté.

### III. Dispersion du biofilm

La dispersion est la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm et permet à la souche de coloniser de nouveaux milieux. Elle peut s'effectuer passivement *via* l'action de stress hydrodynamiques ou activement. Le détachement « passif » de groupes de cellules se fait par l'action de flux ou de forces de cisaillement (Choi & Morgenroth, 2003; Stoodley *et al.*, 1999; Stoodley *et al.*, 2001). La libération active des cellules d'un biofilm se fait en réponse à certains signaux environnementaux, par réduction de leur mobilité flagellaire, changement de leurs propriétés de surface ou suite à la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces mécanismes sont en grande partie régulés par le quorum-sensing et la concentration intracellulaire en c-di-GMP. Les signaux environnementaux et les mécanismes responsables du détachement actifs des cellules sont détaillés dans cette section.

## 1. Signaux environnementaux et régulation de la dispersion des cellules

Lorsque le biofilm a atteint une certaine densité cellulaire, l'accumulation de déchets métaboliques toxiques et l'appauvrissement du milieu en nutriments rendent la dispersion du biofilm bénéfique. Ce phénomène permet ainsi aux cellules de migrer vers des environnements plus favorables.

La dispersion d'un biofilm a été observée en réponse à des carences en carbone, azote ou oxygène (Gjermansen *et al.*, 2005) ainsi qu'à un épuisement en nutriments dans le milieu environnant (Hunt *et al.*, 2004; O'Toole *et al.*, 2000). Chez des souches du genre *Pseudomonas*, il a été montré qu'une faible variation (positive ou négative) de la concentration en nutriments induit la dispersion du biofilm (Karatan & Watnick, 2009). La faible concentration en oxygène dans les couches les plus profondes d'un biofilm a aussi été associée avec une fréquence plus importante d'événements de dispersion chez *Shewanella oneidensis* (Thormann *et al.*, 2005). De la même manière, l'accumulation de réactifs azotés, co-produits de la respiration anaérobie, conduit au détachement des cellules (Karatan & Watnick, 2009).

## 2. Mécanismes de détachement

Le détachement des cellules d'un biofilm est réalisé par différents mécanismes, affectant soit l'intégrité de la matrice extracellulaire *via* la libération d'enzymes extracellulaires ou autres molécules, soit la physiologie des cellules elles-mêmes par modification de leurs propriétés de surface ou par réactivation de leurs fonctions de mobilité.

### a. Dégradation de la matrice extracellulaire

La libération d'enzymes extracellulaires dégradant la matrice du biofilm, par modification des protéines ou digestion des sucres et acides nucléiques qui la composent, est un des mécanismes conduisant à la dispersion des cellules.

*i. Dégradation des protéines extracellulaires*

La libération de protéases dans le milieu extracellulaire conduit à la dégradation des appendices protéiques composant la matrice du biofilm (Lee *et al.*, 1996). Chez *P. putida*, une cystéine protéinase (LapG) modifie LapA, une protéine de surface. Le clivage de LapA entraîne la libération des cellules piégées dans la matrice du biofilm (Gjermansen *et al.*, 2009). Chez *S. aureus*, des concentrations importantes en sérine protéase ont été retrouvées dans le surnageant de culture d'un biofilm en cours de dispersion. Cette enzyme ayant pour cible les protéines de surface, facilite la désagrégation du biofilm (Boles & Horswill, 2008).

Par ailleurs, il a récemment été décrit que l'ajout d'acides aminés sur certains biofilms, dont ceux de *B. subtilis*, entraîne la dispersion des cellules. Cette dispersion est accompagnée par le détachement de fibres protéiques ancrées aux cellules et participant à la structure du biofilm (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010). Le mécanisme d'action des acides aminés sur le détachement de ces fibres n'est pas encore élucidé.

*ii. Dégradation des exopolysaccharides*

En réponse aux stimuli environnementaux, des enzymes libérées dans le milieu extérieur digèrent les sucres composants la matrice du biofilm et favorisent ainsi la dispersion de la population. Ainsi, chez *P. aeruginosa*, l'alginate libérée par les cellules dégrade l'alginate de la matrice. La libération d'enzymes dégradant les sucres peut être accompagnée d'une baisse de la production d'exopolysaccharides (Allison *et al.*, 1998). Par ailleurs, la  $\beta$ -hexosamidase (ou dispersin B) peut être utilisée pour disperser les biofilms pathogènes. En effet, cette enzyme digère le poly-*N*-acetylglucosamine présent dans les biofilms de bactéries Gram négatives et positives (Kaplan *et al.*, 2004; Karatan & Watnick, 2009).

*iii. Digestion de l'ADN extracellulaire*

L'ADN étant un composant essentiel des biofilms, un biofilm peut être artificiellement dispersé par ajout de DNase (Whitchurch *et al.*, 2002). Dans certains

biofilms, tels que celui de *S. aureus*, une thermonucléase est libérée par les cellules pour favoriser leur dispersion (Mann *et al.*, 2009).

#### b. Changement des propriétés de membrane

La modification des propriétés de membrane d'une cellule peut conduire à son détachement du biofilm. La perte des pili de type IV ou la production de substances tensioactives, telles que les rhamnolipides, entraînent le détachement des cellules par modification de leurs propriétés de surface (Karatan & Watnick, 2009). La présence de rhamnolipides dans un biofilm de *P. aeruginosa* conduit par exemple à la dispersion des cellules situées au centre des microcolonies (Boles *et al.*, 2005).

#### c. Remobilisation des cellules

La dispersion d'un biofilm peut être assurée par la réactivation de la mobilité flagellaire des bactéries, mobilité réprimée lors de l'initiation du biofilm (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005). Chez *E. coli*, une carence en carbone induit la synthèse de la protéine CsrA qui active à son tour l'opéron *fliDC*, opéron maître de synthèse du flagelle (Jackson *et al.*, 2002). Ces événements de remobilisation concernent souvent une sous-population de cellules localisée dans les cavités formées au centre des microcolonies lors des événements de mort et lyse cellulaires (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Cette sous-population accède au milieu extérieur *via* des points de passage dans le mur de cellules non mobiles qui l'entoure.

### 3. Régulation de l'étape de dispersion

Les mécanismes responsables de la dispersion des cellules d'un biofilm sont induits en réponse à des stimuli environnementaux, y compris la densité cellulaire. Ils sont essentiellement régulés par le système de quorum-sensing. D'autres molécules signal, à savoir le c-di-GMP et des acides gras, peuvent toutefois jouer un rôle dans leur contrôle.

### a. Régulation par le quorum-sensing

La dispersion des cellules d'un biofilm est généralement régulée par le quorum-sensing. Des mutations dans le système de quorum-sensing entraînent l'agrégation des cellules, mécanisme opposé à la dispersion du biofilm (Davies *et al.*, 1998; Parsek & Greenberg, 2005).

Le quorum-sensing peut être responsable de l'induction de la mobilité flagellaire des cellules à l'intérieur d'un biofilm *via* l'opéron *flhDC* (Purevdorj-Gage *et al.*, 2005). Les molécules signal du quorum-sensing peuvent aussi induire la libération d'enzymes extracellulaires dégradant la matrice extracellulaire (Landini *et al.*, 2010; Stoodley *et al.*, 2002). Chez *S. aureus* par exemple, la libération de la sérine protéase dans le milieu extérieur est régulée par le quorum-sensing *via* le système *agr* (*accessory gene regulator*). Ce système module les facteurs de virulence de la souche en réponse à un peptide autoinducteur. Il est par exemple activé en réponse à une carence en glucose (Boles & Horswill, 2008).

### b. Autres molécules-signal

#### i. Le c-di-GMP

Les facteurs environnementaux ainsi que les phénomènes de quorum-sensing modulent la concentration intracellulaire en c-di-GMP (voir sous-section précédente **I. Initiation du biofilm**). Une diminution de la concentration intracellulaire en c-di-GMP, c'est-à-dire une induction de la synthèse de protéines présentant un domaine EAL et une répression de la synthèse de celles présentant un domaine GGDEF, a été associée à une augmentation des phénomènes de dispersion (Karatan & Watnick, 2009). Chez *P. aeruginosa*, la présence de réactifs azotés induit la dégradation des molécules de c-di-GMP par des phosphodiesterases, ce qui réactive la mobilité des cellules et réprime l'expression des adhésines de surface (Barraud *et al.*, 2009). Toujours chez *P. aeruginosa*, des protéines impliquées dans le chimiotactisme répriment la synthèse de c-di-GMP et induisent ainsi la dispersion du biofilm (Morgan *et al.*, 2006). Chez *P. putida*, la diminution de la concentration intracellulaire en c-di-GMP induit la transcription du gène codant pour la cystéine protéinase LapG, dégradant la protéine de surface LapA (Gjermansen *et al.*, 2009).

*ii. Les acides gras*

Des petits acides gras, comme l'acide *cis*-2-décanoïque, sont des messagers induisant la dispersion de biofilms de bactéries Gram positives et négatives (Karatan & Watnick, 2009). Ces facteurs, diffusant facilement à travers les membranes bactériennes, sont actifs à des concentrations de l'ordre du nanomolaire et correspondent ainsi à des molécules de communication intercellulaire (Davies & Marques, 2009).

**4. Conclusion : caractéristiques de la population dispersée**

Le profil protéique des cellules dispersées est plus proche de celui de cellules planctoniques que de cellules d'un biofilm mature, indiquant un retour à l'état planctonique des bactéries et marquant la fin du cycle de vie développemental du biofilm (Sauer *et al.*, 2002). La population dispersée présente toutefois une diversité phénotypique beaucoup plus importante qu'une population planctonique « ordinaire ». En effet, elle comporte des cellules dites variantes affectées entre autres dans leur mobilité flagellaire et la production d'exopolysaccharides et de surfactants et sont plus promptes à reformer un biofilm (Allegrucci & Sauer, 2007; Boles *et al.*, 2004; Kirisits *et al.*, 2005). La forte hétérogénéité phénotypique de la population dispersée lui confère des capacités d'adaptation à une large gamme d'environnements et donc un avantage écologique important pour la colonisation de nouveaux milieux (Stewart & Franklin, 2008).

## C. Implications des biofilms *in situ* et en bioremédiation

---

L'étude des biofilms bactériens est en plein essor car ils sont impliqués, positivement ou négativement, dans de nombreux processus, médicaux, industriels ou environnementaux. Ils sont particulièrement intéressants dans le domaine de la bioremédiation. Les rôles de ces structures dans l'environnement ainsi que leur utilisation pour la dépollution d'eaux contaminées par l'arsenic sont traités dans cette section.

### I. Impacts et bénéfices des biofilms sur l'homme et l'environnement

#### 1. Les biofilms dans le domaine médical

Dans le domaine médical, de nombreuses infections persistantes sont liées au développement de biofilms. Les biofilms sont en effet difficiles à éliminer, en raison de leur extrême résistance aux agents antibactériens (voir section **A. Définition et résistance au sein des biofilms bactériens**) et de leur propension à se disséminer dans l'organisme *via* les phénomènes de dispersion (voir section **B. Cinétique de développement d'un biofilm**). Ces infections peuvent être liées à l'historique du patient mais aussi au contexte hospitalier *via* le développement de biofilms sur les appareils médicaux (Flemming & Wingender, 2001).

Les infections humaines les plus courantes impliquant des biofilms sont les endocardites sur valve native, les otites de l'oreille moyenne, les prostatites bactériennes chroniques, les parodontites et les infections des voies respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces derniers constituent des terrains favorables aux infections des voies respiratoires car leur système de clairance mucociliaire est déficient. *S. aureus* et *P.*

*aeruginosa* sont les pathogènes les plus souvent responsables de ces infections chroniques (Donlan & Costerton, 2002).

Par ailleurs, les biofilms sont associés à 65% des infections nosocomiales (Mah & O'Toole, 2001). Ces infections sont dues à des contaminations par des biofilms des appareils médicaux tels que les prothèses cardiaques, les cathéters ou encore les lentilles de contact (Donlan & Costerton, 2002).

Le choix des matériaux utilisés permet de limiter les infections liées aux biofilms. Un revêtement hydrophobe et une rugosité minimale préviennent la colonisation du support. Par ailleurs, le traitement antibiotique systémique du patient lors de l'utilisation d'un appareil présentant un risque d'infection nosocomiale a une efficacité très limitée. De nouvelles stratégies de lutte contre la colonisation bactérienne des appareils médicaux, basées par exemple sur l'utilisation des molécules signal du quorum-sensing pour disperser le biofilm, sont en cours de développement (Shunmugaperumal, 2010).

## 2. Biofilms bénéfiques et néfastes dans l'industrie

### a. Impacts négatifs des biofilms dans l'industrie

En **industrie alimentaire**, le développement de biofilms bactériens sur les installations est très problématique. En effet, un biofilm peut se développer en quelques heures seulement et est difficile à éradiquer car très résistant aux lavages et aux désinfections (Carpentier & Cerf, 1993). Par ailleurs, la présence de biofilms sur des **appareils industriels** (« biofouling ») entraîne une perte d'efficacité des processus. Les biofilms qui se développent sur les coques de bateaux augmentent par exemple les forces de frottement en raison de leurs propriétés viscoélastiques. Les biofilms présents sur les échangeurs de chaleur forment une couche isolante et ralentissent le processus d'échange thermique. D'autre part, les biofilms sont à l'origine de phénomènes de corrosion en raison de leurs capacités à lier les métaux. Les sulfures produits par les bactéries sulfato-réductrices

à partir de sulfates interagissent par exemple avec le fer présent dans la surface colonisée, augmentant ainsi sa vitesse de corrosion (Flemming & Wingender, 2001).

#### b. Utilisation des exopolysaccharides dans l'industrie

Les sucres composant la matrice extracellulaire des biofilms sont utilisés en biotechnologie. En industrie alimentaire, ils contribuent par leur viscosité à changer la texture du produit et servent ainsi d'agents gélifiants (ex. gellane, alginate, dextrane) ou d'agent épaississant (ex. xanthane). En cosmétique et pharmacie, ils sont utilisés pour leurs propriétés hydratantes. Les exopolysaccharides sont par ailleurs d'excellents tensioactifs et servent donc à la remobilisation d'huiles résiduelles, comme le pétrole (Davey & O'Toole G, 2000; Neu, 1996).

### 3. Impact des biofilms dans l'environnement

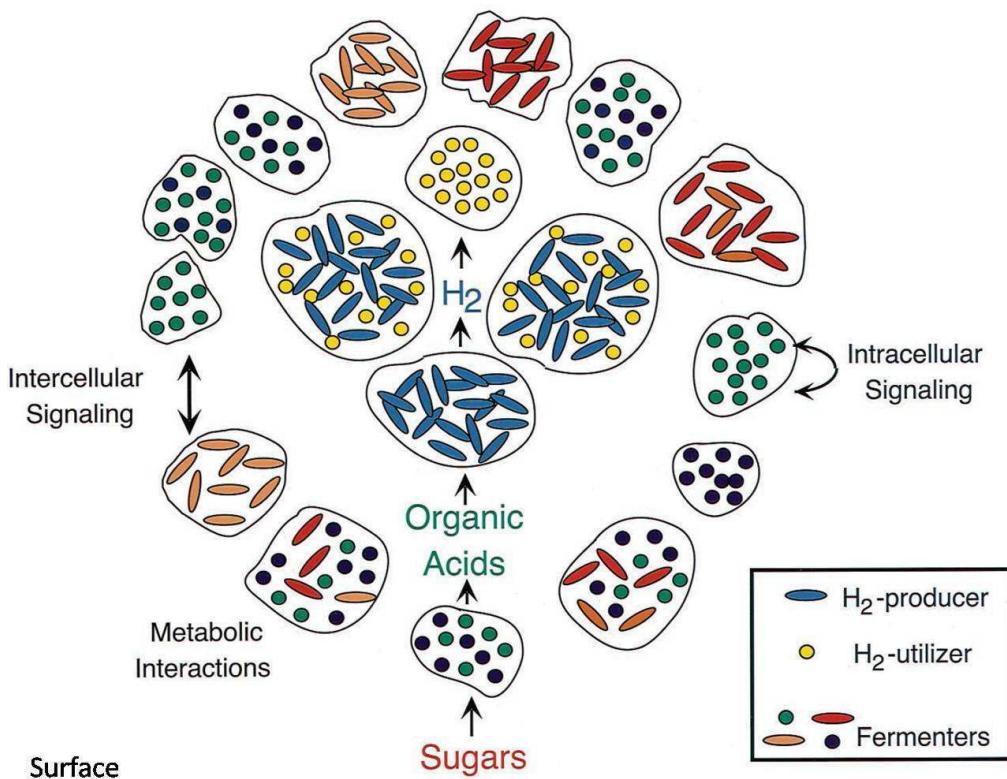
#### a. Rôle des biofilms dans les cycles géochimiques

Dans l'environnement, les biofilms jouent un rôle clé dans la production et la dégradation de la matière organique, dans les cycles de l'azote, du soufre et de nombreux métaux, ainsi que dans la dégradation de polluants. L'organisation de ces structures permet en effet de regrouper des microorganismes aux métabolismes complémentaires et ainsi d'optimiser ces processus (Figure 14).

#### b. Utilisation des biofilms dans les procédés de bioremédiation

L'essor de l'industrie chimique durant les dernières décennies a conduit à la contamination massive de l'environnement *via* le rejet d'effluents toxiques. Etant donné la persistance de ces composés dans l'environnement, ces pollutions représentent un problème écologique à long terme. Les procédés de bioremédiation permettant la décontamination *in situ* de l'environnement grâce à des microorganismes sont plus

avantageux que les techniques physico-chimiques, car moins coûteux et souvent plus efficaces (Singh *et al.*, 2006).



**Figure 14.** Exemple d'organisation spatiale d'un biofilm multispécifique. Les activités métaboliques des différents organismes sont complémentaires. L'organisation spatiale de la communauté permet la mise en place des interactions syntrophiques entre les souches, mais facilite également les interactions physiques et la communication intra- et inter-espèce *via* des facteurs diffusibles (d'après Davey and O'Toole G, 2000).

Utilisés pour la décontamination d'eaux usées depuis 1980 (Singh *et al.*, 2006), les biofilms présentent de plus en plus d'intérêt en bioremédiation. En effet, la croissance de la population bactérienne en biofilm présente de nombreux avantages par rapport à une culture planctonique. Tout d'abord, cette structure permet d'atteindre une concentration importante de biomasse active dans laquelle les substrats et/ou substances toxiques sont véhiculés par transport convectif *via* des canaux d'eau et des pores. Cette forte densité cellulaire est par ailleurs favorable aux événements de transfert de gènes et permet ainsi la dissémination des gènes d'intérêt (Roberts *et al.*, 2001). La proximité et l'organisation spatiale des cellules favorisent aussi la mise en place d'interactions bénéfiques (Stewart &

Franklin, 2008). La matrice du biofilm contribue également à l'efficacité du système de bioremédiation en raison des sites de sorption qu'elle présente, pour les métaux lourds (groupes carboxyliques) et les composés organiques (zones hydrophobes) (Flemming & Wingender, 2001; Singh *et al.*, 2006). Enfin, l'organisation de la population bactérienne d'intérêt en biofilm augmente ses chances de survie par rapport à une existence sous forme planctonique, particulièrement lorsque les conditions environnementales fluctuent (voir section **A. Définition et résistance au sein des biofilms bactériens**).

#### c. Bioremédiation des métaux et métalloïdes

Trois types de processus bactériens sont particulièrement intéressants pour la bioremédiation des métaux et métalloïdes. Il s'agit des phénomènes de transformation, de sorption et de minéralisation. La **transformation** de l'état d'oxydation des métaux et métalloïdes permet de modifier leur solubilité, mobilité et toxicité. Elle est réalisée par les bactéries *via* un mécanisme de détoxication ou énergétique. La **sorption** est la séquestration passive des contaminants par interaction avec la biomasse bactérienne, vivante ou morte. Les groupements phosphates et carboxyliques des exopolysaccharides jouent un rôle clé dans la séquestration des métaux. Ce processus permet de concentrer les contaminants. Une réduction du volume de la matrice est ensuite possible. La **minéralisation** est la formation d'un précipité métallique non soluble par interaction avec un produit métabolique bactérien.

Les biofilms sont des structures particulièrement favorables à ces trois processus, en raison de l'importante densité cellulaire, la présence des exopolymères ainsi que des gradients chimiques et des conditions physico-chimiques (pH, potentiel redox) qui s'y exercent (Barkay & Schaefer, 2001; Singh *et al.*, 2006). Les métaux lourds, tels que le plomb, le cadmium et le nickel, sont retenus par les exopolysaccharides de boues activées *via* des mécanismes d'échanges de protons et de cations et de micro-précipitation (Guibaud *et al.*, 2005; Guibaud *et al.*, 2006). Certaines souches bactériennes sont capables de transformer le métal en une forme moins毒ique, puis de le séquestrer au sein d'une matrice d'exopolysaccharides. C'est le cas d'une souche de *Streptomyces* qui réduit le Cr(VI) en Cr(III), forme moins毒ique, avant de le piéger (Morales *et al.*, 2007).

Toutefois, les activités enzymatiques d'intérêt des biofilms peuvent varier en fonction des conditions physico-chimiques. Des faibles variations de pH et de température modifient par exemple les capacités d'oxydation du Fe(II) des biofilms du genre *Thiobacillus ferrooxidans* (Karamanev & Nikolov, 1988). Ce processus bactérien conduisant à la formation de sulfate de fer est utilisé pour supprimer le sulfure d'hydrogène présent dans les biogaz (Park *et al.*, 2005). Le développement d'un procédé de bioremédiation optimal nécessite ainsi de pouvoir anticiper le comportement de la population bactérienne d'intérêt *in situ*, en réponse aux différents paramètres environnementaux et à leurs fluctuations. Pour cela, il est essentiel de se familiariser avec la physiologie de la population et de comprendre la régulation des processus d'intérêt. Cette approche est détaillée dans la section suivante, dans un contexte de bioremédiation d'eaux contaminées par l'arsenic.

## II. Bioremédiation des eaux contaminées par l'arsenic

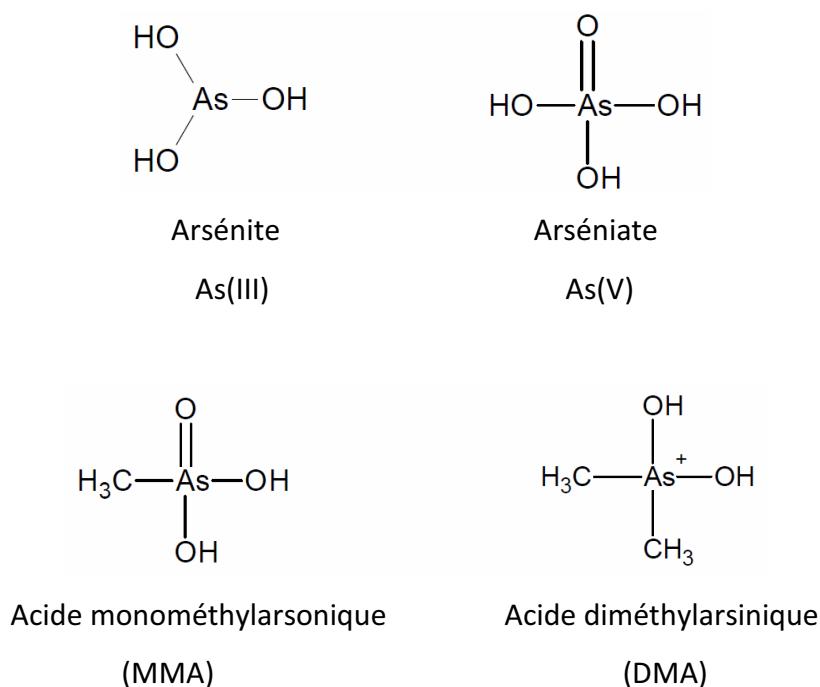
### 1. Généralités sur l'arsenic

#### a. L'arsenic dans les aquifères

##### i. Propriétés chimiques de l'arsenic

L'arsenic est un métalloïde d'origine naturelle et le 20<sup>e</sup> élément le plus abondant dans la croûte terrestre avec des teneurs de l'ordre de 1 à 3 mg kg<sup>-1</sup>. La concentration moyenne dans les sols a été évaluée à 7 mg (As) kg<sup>-1</sup> (Matschullat, 2000). Il entre dans la composition de plus de 200 minéraux dont les plus courants sont le réalgar (AsS), l'orpiment (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>), l'arsenopyrite (FeAsS), la claudétite (As<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) et les arsénures métalliques de fer, nickel et cobalt (O'day, 2006). Il possède un numéro atomique de 33 et un poids moléculaire de 74.9, et peut exister à l'état métallique As(0), trivalent As(+III) et As(-III) et pentavalent

As(+V). Il est couramment retrouvé dans les eaux sous forme inorganique d'arsénite  $H_nAsO_3^{2-n}$  (+III) et d'arséniate  $H_nAsO_4^{3-n}$  (+V) en fonction des conditions d'Eh et de pH (Figures 15 et 16) (Smedley *et al.*, 2001). Il peut aussi être retrouvé de manière très minoritaire sous forme organique, suite à certaines activités biologiques, telles des méthylations. Les acides monométhylarsonique et diméthylarsinique peuvent alors être formés (Figure 15).

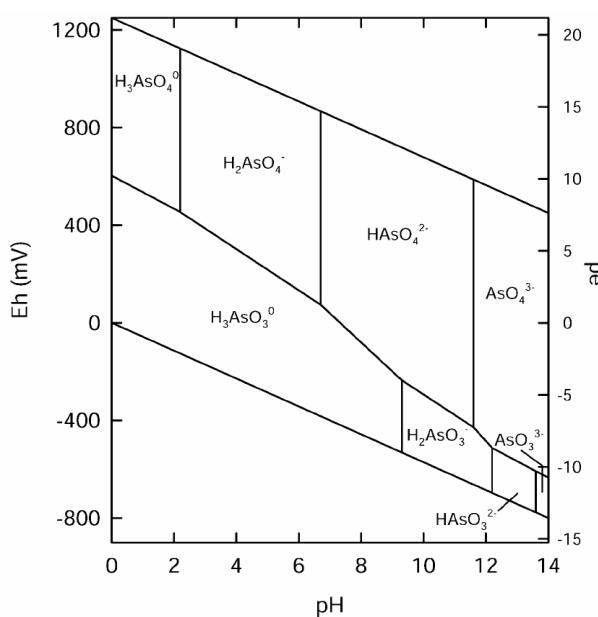


**Figure 15.** Formes majoritaires inorganiques (en haut) et organiques (en bas) de l'arsenic.

### *ii. Sources et origines de contaminations*

Les sources d'arsenic dans l'environnement sont naturelles (fond géologique, volcanisme, érosion) mais aussi anthropiques. En effet, l'arsenic est utilisé sous différentes formes en agriculture, en pharmacologie, en tant qu'additif alimentaire ou encore pour le traitement du bois (Mandal & Suzuki, 2002). Une des sources anthropiques les plus importantes est indirecte : elle est liée au lessivage des stériles miniers enrichis en divers métaux lourds et métalloïdes conduisant à la formation de **drainages miniers acides**. En effet, les minéraux soufrés affleurant à la surface des stériles miniers sont oxydés par

contact avec l'atmosphère et l'eau, ce qui conduit à la formation d'acide sulfurique et à la solubilisation des métaux présents. Les eaux de lessivage présentent des pH très acides et des teneurs en métaux, dont le fer, très importantes, créant ainsi des milieux hostiles à la vie (Johnson & Hallberg, 2003).



**Figure 16.** Diagramme Eh-pH pour les espèces de l'arsenic dans le système As-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O à 25°C et 1 bar de pression (Smedley *et al.*, 2001).

## b. Toxicité et normes

### i. Toxicité

La toxicité et la biodisponibilité de l'arsenic dépendent de sa spéciation. Cette dernière est liée aux conditions physico-chimiques de l'environnement mais est aussi fortement influencée par les transformations microbiennes (comprenant l'oxydation, la réduction et la méthylation). Parmi les formes inorganiques de l'arsenic, l'As(III) est plus毒ique et plus soluble, donc plus biodisponible, que l'As(V). Au niveau de la cellule, l'As(III) inhibe les enzymes en se fixant aux groupements -SH et -OH. L'As(V), un analogue du phosphate, entre en compétition avec ce dernier au niveau de la phosphorylation oxydative ou de l'hélice d'ADN, inhibant entre autres les mécanismes de réparation de l'ADN (Mandal

& Suzuki, 2002). Par ailleurs, les formes inorganiques de l'arsenic inhibent la respiration ce qui génère un stress oxydatif. Les espèces oxygénées réactives peuvent causer des mutations à l'ADN (Liu *et al.*, 2005).

Les formes inorganiques de l'arsenic ont longtemps été considérées comme plus toxiques que les formes organiques. La méthylation de l'arsenic par certains organismes apparait donc comme un processus de détoxication (Gebel, 2002; Vahter, 2002). Cependant, certaines études ont montré que la méthylation de l'arsenic inorganique engendre des intermédiaires et produits, particulièrement au degré d'oxydation +III, dont la toxicité dépasse celle de l'As(III) (Petrick *et al.*, 2000; Styblo *et al.*, 2000).

Au niveau de l'organisme, la toxicité de l'arsenic est fonction de sa forme chimique, son état d'oxydation, son état physique mais aussi du taux d'absorption et d'élimination. Une fois dans l'organisme, l'arsenic est réduit en As(III). Des groupements méthyle sont ensuite ajoutés par des As-methyltransférases présentes dans le foie. L'arsenic est ensuite éliminé, jusqu'à un certain seuil par les urines, sous forme d'acides monométhylarsonique et diméthylarsinique (Mandal & Suzuki, 2002). Une intoxication aiguë à l'arsenic conduit à un « choléra arsenical » dont les symptômes sont proches d'une gastroentérite aiguë. Une intoxication chronique provoque des troubles respiratoires, cardiovasculaires, gastro-intestinaux, hépatiques, rénaux, dermatologiques ou encore neurologiques (Abernathy *et al.*, 1999).

#### *ii. Normes*

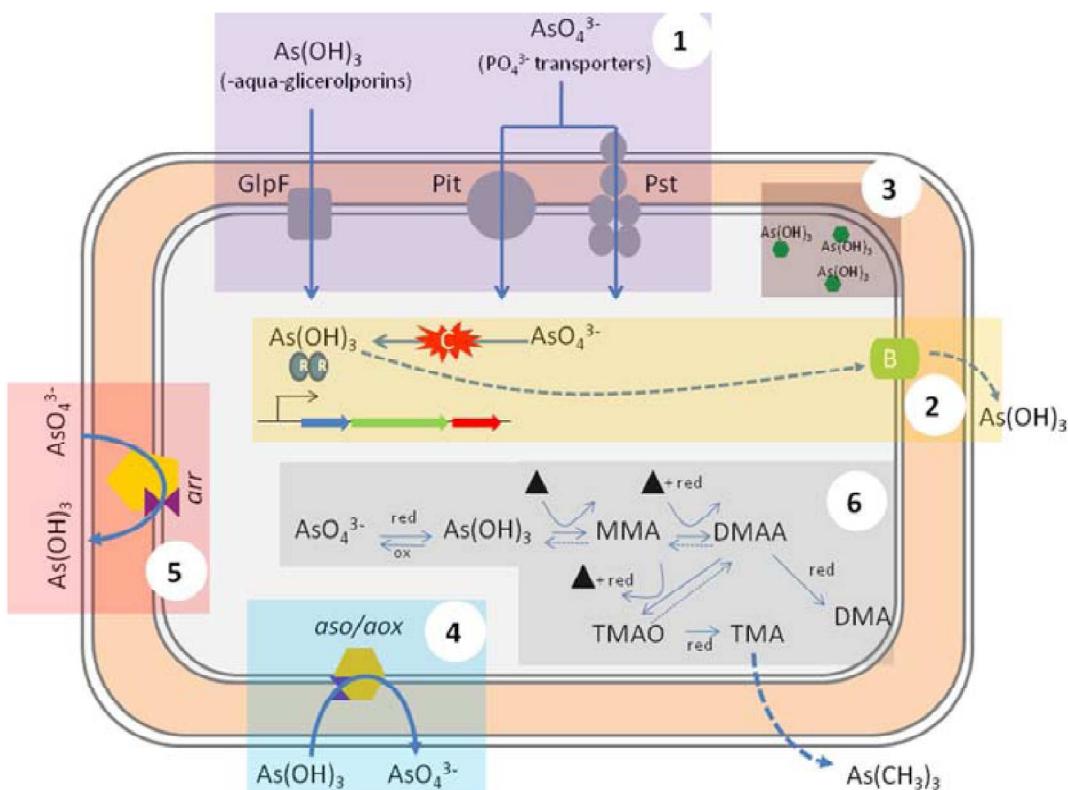
La contamination des ressources en eau par l'arsenic représente ainsi un risque majeur pour la santé humaine. Le cas extrême concerne le Bangladesh et l'Inde où 50 millions de personnes sont quotidiennement exposées à des eaux de boisson présentant des concentrations en arsenic supérieures à  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (Smith *et al.*, 2000). La contamination des eaux par l'arsenic a été reconnue comme une menace majeure pour la santé par l'OMS, l'UE et l'EPA (U.S. Environmental Protection Agency). La « concentration maximale admissible »

(droit européen) et la « limite de qualité » (droit français) ont été fixées à  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  pour les eaux destinées à la consommation humaine.

Les problèmes de santé publique liés à l'arsenic sont principalement dus à la consommation d'eaux contaminées. La présence d'arsenic dans les eaux est influencée par des processus abiotiques (phénomènes d'adsorption/désorption et de précipitation/dissolution) mais aussi microbiens (oxydation, réduction et méthylation). Les processus de mobilisation et précipitation microbiens sont détaillés dans le paragraphe suivant.

#### c. Métabolismes bactériens de l'arsenic

Les métabolismes bactériens de l'arsenic influencent fortement la spéciation du métalloïde dans l'environnement. Les transformations bactériennes sont la réduction de l'As(V), l'oxydation de l'As(III) et les réactions de méthylation (Figure 17) (Silver & Phung, 2005). La réduction de l'As(V) en As(III) peut correspondre à un mécanisme de défense. Dans ce cas, elle est catalysée dans la cellule par une arséniate réductase et l'As(III) formé est excrété à l'extérieur de la cellule par une pompe transmembranaire. Par ailleurs, lorsque l'As(V) est réduit par une arséniate réductase respiratoire, située dans le périplasme, il sert d'accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire (Mukhopadhyay et al., 2002). L'oxydation de l'As(III) en As(V) est réalisée par une arsénite oxydase, constituée de deux sous-unités. Des bactéries chimiolithotrophes sont capables d'utiliser les électrons de la réaction dans leur métabolisme énergétique (Battaglia-Brunet et al., 2006; Oremland & Stolz, 2003). L'oxydation de l'As(III) en As(V) conduit par ailleurs à une détoxication partielle du milieu. Enfin, la méthylation de l'As(III) en composés mono- ou di-méthylés est réalisée par une succession de réactions de réduction et de méthylation. Cette transformation correspond potentiellement à un mécanisme de détoxication (Bentley & Chasteen, 2002).



**Figure 17.** Métabolismes bactériens de l'arsenic (Paez-Espino *et al.*, 2009). **(1)** L'entrée de l'arsenic dans la cellule se fait *via* des transporteurs du phosphate pour l'As(V) et *via* des aquaglycéroporines pour l'As(III). **(2)** Une fois dans la cellule, l'As(V) peut être réduit en As(III) par une arséniate réductase (ArsC). L'As(III) formé sera expulsé hors de la cellule par ArsB, une pompe d'efflux spécifique. **(3)** L'As(III) peut également être immobilisé en se complexant avec des peptides riches en cystéine. **(4)** Par ailleurs, l'As(III) peut servir de donneur d'électron lors de son oxydation en As(V) par l'arsénite oxydase. **(5)** D'autre part, l'As(V) peut être utilisé comme accepteur final d'électron lors de la respiration. **(6)** Enfin, l'arsenic peut subir des méthylations successives.

## 2. Remédiation des eaux contaminées par l'arsenic

### a. Remédiation chimique

Les eaux contaminées par l'arsenic sont pour la plupart traitées de manière chimique. Le choix de la technique de remédiation à utiliser dépend des propriétés chimiques de l'eau, dont le pH et la teneur en fer et manganèse, mais aussi de son coût. Les deux techniques les plus utilisées dans les pays en voie de développement sont la co-précipitation de l'arsenic et la filtration des eaux contaminées. Ces deux techniques nécessitent l'oxydation préalable de

l'As(III) en As(V) par des oxydants tels que le permanganate de potassium, le peroxyde d'hydrogène ou l'ozone. Une fois l'As(III) oxydé, la première technique consiste à ajouter un coagulant, tel que du chlorure de fer ou du sulfate d'ammonium. L'As(V) va précipiter avec le coagulant et être adsorbé sur le précipité. La deuxième méthode consiste à filtrer l'eau contaminée à travers un milieu solide qui retient l'As(V), tel que l'alumine activée, le charbon actif et des hydroxydes de fer. Le milieu solide peut être soit traité comme un déchet final, soit régénéré (Sullivan *et al.*, 2010).

Une méthode d'électrocoagulation, plus onéreuse mais plus efficace que les deux premières, est de plus en plus utilisée. Elle est basée sur l'utilisation d'anodes de fer, aluminium ou titane. Lors de l'électrolyse, le métal arraché à l'anode forme des oxydes sur lesquels se fixent les oxyanions de l'arsenic. L'oxydation préalable de l'As(III) en As(V) n'est pas nécessaire (Kumar *et al.*, 2004).

Ces techniques de remédiation chimique nécessitent toutefois l'ajout de réactifs, notamment pour l'oxydation de l'As(III). Leur coût devient rapidement prohibitif lorsque la remédiation doit se faire à grande échelle. Aussi des techniques de remédiation biologique, particulièrement attractives du point de vue financier et s'intégrant dans une politique de développement durable, sont actuellement développées.

#### b. Bioremédiation

La remédiation biologique des eaux contaminées par l'arsenic peut être réalisée de manière passive ou dynamique. Le **traitement passif** consiste à laisser la population microbienne endogène coloniser un biofiltre à travers lequel l'eau à traiter circule librement. L'installation du biofiltre permet d'augmenter le temps de contact entre la population microbienne et l'eau contaminée. Des techniques de traitement passif sont déjà utilisées pour décontaminer certains sites de drainage minier acide, comme celui de Lopérec (Finistère) (Lièvremont *et al.*, 2009). Dans le cadre d'un **traitement dynamique**, l'effluent est injecté dans un bioréacteur contenant un garnissage présentant une surface de contact très importante (ex. pouzzolane) qui est colonisé par la population microbienne d'intérêt.

La majorité des procédés développés sont basés sur l'oxydation de l'As(III) en As(V) (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002). Celle-ci peut être réalisée de manière directe par une population arsénite-oxydante ou indirecte par des bactéries ferro- ou manganèse-oxydantes par exemple. Les méthodes indirectes présentent l'avantage de permettre une immobilisation de l'arséniate par co-précipitation avec les oxydes de fer ou de manganèse formés (Zouboulis & Katsoyiannis, 2005). Dans le cas d'une oxydation directe, le piégeage de l'arséniate peut être réalisé par un filtre composé d'hydroxydes de fer ou de manganèse. Dans un cas idéal, l'arsénic est piégé de manière passive dans des exopolymères synthétisés par la population microbienne, comme précédemment observé *in vitro* pour une culture d'*Herminiimonas arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007). Une méthode basée sur la réduction de l'As(V) en As(III) par des bactéries arséniate-réductrices est mise en œuvre au Canada pour le traitement d'effluents d'une ancienne mine d'or (Wahlquist & Pickett, 2003). L'As(III) formé est précipité avec des sulfures.

Le choix de la méthode à utiliser dépend des paramètres physico-chimiques du site (pH, teneurs en arsenic, fer, manganèse et soufre, et spéciation de l'arsenic...) et de leurs variations mais aussi du débit de l'effluent à traiter et de la concentration maximale en arsenic à atteindre en fin de traitement. Une mise au point des techniques est donc nécessaire pour qu'elles soient compétitives par rapport aux méthodes chimiques.

#### c. Caractéristiques de la population microbienne d'intérêt

Le choix de la souche microbienne dépend fortement des caractéristiques de l'eau à traiter. En fonction de la teneur en matière organique de l'effluent, la sélection va se porter sur une souche au métabolisme autotrophe, mixotrophe ou organotrophe. Par ailleurs, la teneur en fer et manganèse va être déterminante pour le choix de la population, arsénite-oxydante ou ferro- ou manganèse-oxydante. La population d'intérêt doit en effet être capable de se maintenir dans le système de remédiation, mais aussi d'y être active. Il est donc essentiel de bien connaître la physiologie de la souche et la régulation *in situ* des processus d'intérêt que sont ses activités d'oxydation et la formation d'un biofilm, afin de pouvoir anticiper le comportement de la souche *in situ*.

### C. Implications des biofilms *in situ* et en bioremédiation

---

L'utilisation d'une souche se développant préférentiellement sous forme de biofilm présente de nombreux intérêts. D'une part, la matrice extracellulaire présente l'avantage de pouvoir fixer une quantité plus ou moins importante d'arsenic (Muller *et al.*, 2007). D'autre part, l'organisation en biofilm favorise la persistance de la souche dans le bioprocédé en lui permettant d'adhérer au garnissage et ainsi de résister aux forces de courant. Enfin, un biofilm est plus à même à faire face aux fluctuations environnementales (variations de la teneur en arsenic, du pH etc.) car il présente plus de diversité génétique qu'une population planctonique.

# **OBJECTIFS**

---

L'arsenic est un métalloïde naturellement présent dans la croûte terrestre qui entre dans les cycles biogéochimiques par des mécanismes naturels, tels que le volcanisme et l'érosion éolienne et hydrique, mais aussi par le biais d'activités anthropiques, minières, industrielles ou agricoles. Les expositions à l'arsenic entraînent d'importants problèmes de santé publique et sont le plus souvent liées aux apports en eau. L'arsenic s'y trouve majoritairement sous forme inorganique aux degrés d'oxydation (III) (arsénite) et (V) (arséniate), l'As(V) étant moins soluble et moins毒ique que l'As(III) (Mandal & Suzuki, 2002).

Actuellement des procédés de remédiations chimiques sont utilisés pour dépolluer les eaux contaminées à l'arsenic. La remédiations se divise en deux étapes : oxydation de l'As(III) en As(V) et immobilisation de l'As(V). Le projet COBIAS (**C**Ompréhension du rôle du **B**iofilm bactérien et maîtrise de son développement lors du traitement d'eaux **A**rSéniées en bioréacteurs à lit-fixe) dirigé par le **B**ureau des **R**echerches **G**éologiques et **M**inières (BRGM) et financé par l'ANR PRECODD (**P**rogramme de **R**eccherche sur les **E**COtechnologies et le **D**éveloppement **D**urable) a débuté en 2007 (<http://cobias.brgm.fr>). Il regroupe les Universités de Strasbourg et de Limoges, Soléanche-Bachy (entreprise générale de fondations et de technologies du sol), Eco-solution (entreprise de biotechnologies spécialisée dans l'évolution dirigée de micro-organismes) et le groupe SAUR (gestion des services de distribution d'eau et d'assainissement). Ce projet vise à développer un procédé de remédiations biologiques des eaux contaminées par l'arsenic, et plus particulièrement par l'As(III), mettant à profit des processus bactériens, l'activité arsénite-oxydante et les propriétés d'adhésion et de séquestration des biofilms. Un tel procédé est *a priori* moins coûteux que les techniques chimiques et permet de plus d'éviter les pollutions annexes liées à l'utilisation de composés chimiques très oxydants. Les souches du genre *Thiomonas*, retrouvées de manière ubiquitaire dans les environnements contaminés par l'arsenic (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006; Bruneel *et al.*, 2003; Hallberg & Johnson, 2003) sont particulièrement intéressantes pour la bioremédiations d'eaux contaminées par l'arsenic. La plupart de ces bactéries présentent en effet une activité arsénite-oxydase et certaines sont capables de croissance en conditions chimiolithoautotrophes, en utilisant l'As(III) comme donneur d'électrons. Ces souches, et plus particulièrement *Thiomonas arsenivorans*, ont été sélectionnées comme souches d'intérêt pour le procédé de bioremédiations. Une bonne

connaissance de leur physiologie et dynamique génomique ainsi que du biofilm qu'elles forment est essentielle pour développer un bioprocédé à l'efficacité optimale, c'est-à-dire pour maîtriser le développement et la stabilité du biofilm. La thèse, financée par ce projet, avait pour objectif de caractériser diverses souches d'intérêt, au niveau physiologique et génomique, et d'évaluer l'impact de l'arsenic sur la formation et le développement du biofilm qu'elles forment.

La physiologie de souches du genre *Thiomonas* a été prioritairement étudiée, notamment leurs métabolismes du carbone et de l'arsenic. Le profil protéique des deux souches chimiolithoautotrophes *Thiomonas arsenivorans* et *Thiomonas* sp. 3As a été analysé en réponse à l'As(III). Dans un deuxième temps, le génome des différentes souches de *Thiomonas* a été comparé par puces CGH (**C**omparative **G**enomic **H**ybridization) avec celui de *Thiomonas* sp. 3As, récemment séquencé. Le but de cette approche était de définir la diversité génétique des *Thiomonas* et d'évaluer l'impact de l'environnement sur l'évolution des génomes.

L'effet de l'arsenic sur la formation et le développement des biofilms a été déterminé par microscopie confocale sur *Thiomonas* sp. CB2, souche d'intérêt ayant une forte propension à former des biofilms, et *Herminiimonas arsenicoxydans*, utilisée comme souche de référence. Le métabolisme de l'arsenic de cette dernière, isolée de boues activées fortement contaminées par l'arsenic d'une station d'épuration industrielle, a fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années (Carapito *et al.*, 2006; Koechler *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2009). La cinétique de développement du biofilm des deux souches a été suivie en présence et en absence d'As(III) afin d'identifier l'impact de l'As(III) sur la mise en place et l'évolution de ces communautés bactériennes.

Les travaux réalisés lors de cette thèse sont présentés sous forme d'articles scientifiques ou de manuscrits en cours de préparation.



# **CHAPITRE 1. PHYSIOLOGIE ET GENOMIQUE DES SOUCHES DU GENRE *THIOMONAS***

---

## A. Introduction

---

La première partie de ce travail de thèse repose sur l'étude de l'adaptation physiologique et génomique des souches du genre *Thiomonas* à leur environnement, et en particulier aux stress arséniques. L'objectif de cette étude est d'acquérir des connaissances sur la physiologie et la dynamique du génome de ces souches d'intérêt en vue de leur utilisation pour le traitement d'eaux arsénées.

Les souches du genre *Thiomonas* sont retrouvées de manière ubiquitaire dans les milieux contaminés par l'arsenic, dont les drainages miniers acides qui sont des milieux extrêmes dans lesquels peu d'organismes sont capables de survivre (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006; Bruneel *et al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2008; Johnson & Hallberg, 2003; Johnson & Hallberg, 2005). Ces  $\beta$ -protéobactéries appartenant à l'ordre des Burkholderiales sont capables d'utiliser l'énergie résultant de l'oxydation de composés soufrés réduits inorganiques et sont définies comme étant chimiolithoautotrophes facultatives. Certaines d'entre elles sont capables d'oxyder l'As(III) en As(V), à des fins de détoxication ou comme source d'énergie (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006; Duquesne *et al.*, 2008).

Les mécanismes d'adaptation des différentes souches du genre *Thiomonas* à leur environnement et plus particulièrement à l'arsenic sont très peu documentés. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps au métabolisme de l'arsenic de cinq de ces souches, oxydant l'arsénite (*Thiomonas arsenivorans*, *Tm.* spp. 3As et WJ68) ou non (*Tm. perometabolis* et *Tm. sp. Ynys1*) (Article 1 : Bryan *et al.*, 2009). La physiologie de ces souches phylogénétiquement proches a été comparée par des tests de croissance, d'oxydation et de résistance à l'arsenic. Le rôle énergétique potentiel de l'activité arsénite-oxydase a été testé par des tests de mobilité réalisés en absence et en présence d'As(III). Ce rôle énergétique avait été suggéré chez *Herminiimonas arsenicoxydans*, une souche arsénite-oxydante dont la mobilité est induite par l'As(III) (Muller *et al.*, 2007). D'autre part, la présence de gènes impliqués dans le métabolisme de l'arsenic a été déterminée par des approches de PCR.

## Chapitre 1. Physiologie et génomique de souches du genre *Thiomonas*

### A. Introduction

---

Enfin, *Thiomonas arsenivorans* et *Tm. sp. 3As* étant capables de croissance en autotrophie et d'utiliser l'As(III) comme donneur d'électrons, une approche de protéomique différentielle a été mise en œuvre pour déterminer les points communs et les différences dans leur réponse à l'arsenic.

Dans un deuxième temps, huit souches du genre *Thiomonas*, isolées ou non de drainages miniers acides contaminés par l'arsenic, ont été comparées au niveau génomique (Article 2 : Arsène-Ploetze *et al.*, 2010). Le génome de l'une d'entre elles, *Thiomonas sp. 3As*, isolée du drainage minier acide de Carnoulès (Gard, France), a été séquencé, annoté et analysé en détail afin d'identifier les mécanismes d'adaptation potentiels de cette souche à son environnement. Son génome a ensuite été comparé à celui de sept autres souches du genre *Thiomonas* par puces CGH (Comparative Genomic Hybridization). Le but de cette approche est d'identifier les gènes spécifiques aux souches isolées de drainages miniers acides et ainsi d'évaluer l'impact de l'environnement sur l'évolution de leurs génomes.

Les souches du genre *Thiomonas* étudiées dans le cadre de ces travaux sont listées dans le tableau 1.

J'ai contribué au travail présenté dans l'article 1 (Bryan *et al.*, 2009) en réalisant des tests de mobilité et en analysant les données de protéomique. J'ai également aidé à la rédaction du manuscrit. Ma participation au travail présenté dans l'article 2 (Arsène-Ploetze *et al.*, 2010) a consisté en l'analyse du génome de *Thiomonas sp. 3As* (notamment en identifiant les gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides et la région du prophage) et la réalisation des tests physiologiques sur les différentes souches (formation de biofilm, expression des phages).

# Chapitre 1. Physiologie et génomique de souches du genre *Thiomonas*

## A. Introduction

	Origine	Concentration en arsenic	Référence
<b><i>Thiomonas</i> sp. 3As</b>	Drainage minier acide d'une ancienne mine de Pb et Zn, 30 m de la source (Carnoulès, Gard, France)	≈ 3 mM	(Duquesne <i>et al.</i> , 2008)
<b><i>Thiomonas</i> sp. CB1</b>	Drainage minier acide d'une ancienne mine de Pb et Zn, 30 m de la source (Carnoulès, Gard, France)	≈ 3 mM	(Arsène-Ploetze <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Thiomonas</i> sp. CB2</b>	Drainage minier acide d'une ancienne mine de Pb et Zn, 30 m de la source (Carnoulès, Gard, France)	≈ 3 mM	(Arsène-Ploetze <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Thiomonas</i> sp. CB3</b>	Drainage minier acide d'une ancienne mine de Pb et Zn, 30 m de la source (Carnoulès, Gard, France)	≈ 3 mM	(Arsène-Ploetze <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Thiomonas</i> sp. CB6</b>	Drainage minier acide d'une ancienne mine de Pb et Zn, 30 m de la source (Carnoulès, Gard, France)	≈ 3 mM	(Arsène-Ploetze <i>et al.</i> , 2010)
<b><i>Thiomonas arsenivorans</i></b>	Résidus d'une ancienne mine d'Au (Cheni, Limousin, France)	≈ 6 g Kg <sup>-1</sup>	(Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006)
<b><i>Thiomonas</i> sp. Ynys1</b>	Drainage minier acide d'anciennes mines de charbon (Ynysarwed, Wales, UK)	≈ 0.1 g Kg <sup>-1</sup>	(Hallberg & Johnson, 2003)
<b><i>Thiomonas</i> sp. WJ68</b>	Bioréacteur d'un système de traitement passif d'un effluent d'une ancienne mine de Sn (Wheal Jane, Cornwall, UK)	≈ 0.08 mM	(Johnson & Hallberg, 2005)
<b><i>Thiomonas perometabolis</i></b>	Echantillon de sol d'un chantier (Los Angeles, USA)	?	(London & Rittenberg, 1967)

**Tableau 1.** Origine des souches du genre *Thiomonas* étudiées dans les deux travaux de ce chapitre. Les souches dont le nom est en gras sont capables d'oxyder l'As(III), celles dont le nom est souligné sont capables d'utiliser l'As(III) comme donneur d'électrons. La concentration en arsenic indiquée représente la teneur en arsenic total des sédiments ou de l'eau desquels ont été isolées les différentes souches.

## **B. Etude physiologique de souches du genre *Thiomonas***

---

### **Article 1 :**

**Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes**

C. G. Bryan, M. Marchal, F. Battaglia-Brunet, V. Kugler, C. Lemaitre-Guillier, D. Lièvremont, P. N. Bertin and F. Arsène-Ploetze

*BMC Microbiology*, 2009, **9**:127

## Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes

Christopher G Bryan<sup>†1,4</sup>, Marie Marchal<sup>†1</sup>, Fabienne Battaglia-Brunet<sup>2</sup>, Valérie Kugler<sup>1</sup>, Christelle Lemaitre-Guillier<sup>3</sup>, Didier Lièvremont<sup>1</sup>, Philippe N Bertin<sup>1</sup> and Florence Arsène-Ploetze\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR 7156 CNRS and Université de Strasbourg, 28, rue Goethe, 67000 Strasbourg, France, <sup>2</sup>BRGM, Environnement et Procédés, Unité Ecotechnologie, Avenue Claude Guillemin, 45060 Orléans, France, <sup>3</sup>Plateforme Protéomique, IFR 1589 CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France and <sup>4</sup>Current address: Centre for Bioprocess Engineering Research, Department of Chemical Engineering, University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa

Email: Christopher G Bryan - chris.bryan@gem.u-strasbg.fr; Marie Marchal - Marie.Marchal@gem.u-strasbg.fr; Fabienne Battaglia-Brunet - f.battaglia@brgm.fr; Valérie Kugler - valerie.kugler@gem.u-strasbg.fr; Christelle Lemaitre-Guillier - Christelle.Guillier@dijon.inra.fr; Didier Lièvremont - didier.lièvremont@gem.u-strasbg.fr; Philippe N Bertin - philippe.bertin@gem.u-strasbg.fr; Florence Arsène-Ploetze\* - Florence.ploetze@gem.u-strasbg.fr

\* Corresponding author    †Equal contributors

Published: 23 June 2009

Received: 25 March 2009

BMC Microbiology 2009, **9**:127 doi:10.1186/1471-2180-9-127

Accepted: 23 June 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/127>

© 2009 Bryan et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** *Thiomonas* strains are ubiquitous in arsenic-contaminated environments. Differences between *Thiomonas* strains in the way they have adapted and respond to arsenic have never been studied in detail. For this purpose, five *Thiomonas* strains, that are interesting in terms of arsenic metabolism were selected: *T. arsenivorans*, *Thiomonas* spp. WJ68 and 3As are able to oxidise As(III), while *Thiomonas* sp. YnysI and *T. perometabolis* are not. Moreover, *T. arsenivorans* and 3As present interesting physiological traits, in particular that these strains are able to use As(III) as an electron donor.

**Results:** The metabolism of carbon and arsenic was compared in the five *Thiomonas* strains belonging to two distinct phylogenetic groups. Greater physiological differences were found between these strains than might have been suggested by 16S rRNA/rpoA gene phylogeny, especially regarding arsenic metabolism. Physiologically, *T. perometabolis* and YnysI were unable to oxidise As(III) and were less arsenic-resistant than the other strains. Genetically, they appeared to lack the *aox* arsenic-oxidising genes and carried only a single *ars* arsenic resistance operon. *Thiomonas arsenivorans* belonged to a distinct phylogenetic group and increased its autotrophic metabolism when arsenic concentration increased. Differential proteomic analysis revealed that in *T. arsenivorans*, the *rbc/cbb* genes involved in the assimilation of inorganic carbon were induced in the presence of arsenic, whereas these genes were repressed in *Thiomonas* sp. 3As.

**Conclusion:** Taken together, these results show that these closely related bacteria differ substantially in their response to arsenic, amongst other factors, and suggest different relationships between carbon assimilation and arsenic metabolism.

## Background

Microorganisms play an essential role in shaping the natural environment. They have evolved specific metabolic pathways allowing them to utilise a wide range of substrates, many of which are toxic to higher organisms. Through the conversion of both anthropogenic and naturally occurring pollutants to less toxic products, such microorganisms effect widespread natural bioremediation. An important toxic compound is arsenic, a metalloid that can cause multiple health effects including diabetes, hypertension, skin lesions and skin and internal cancers [1]. Arsenic occurs in soils and water bodies both naturally and as a result of anthropogenic processes. A major anthropogenic source is the mining industry, where the processing of sulfide ores produces large quantities of sulfidic wastes which may be rich in arsenic-bearing compounds such as arsenopyrite. The weathering of these minerals leads to the formation of acid mine drainage (AMD), generally characterised by elevated sulfate, iron and other metal concentrations [2], and thus the transport of many toxic elements such as inorganic forms of arsenic, arsenite ( $\text{As(III)}$ ) and arsenate ( $\text{As(V)}$ ). This often results in chronic and severe pollution of the surrounding environment, with a substantial reduction of the indigenous biota.

Numerous arsenic-oxidising microorganisms, especially *Proteobacteria*, are able to oxidise  $\text{As(III)}$  to  $\text{As(V)}$  in order to detoxify their immediate environment. This biological  $\text{As(III)}$  oxidation is of particular importance,  $\text{As(III)}$  being more soluble and more toxic than  $\text{As(V)}$  [3]. Additionally, in acidic environments such as those impacted by AMD, natural remediation can occur as a result of the concurrent oxidation of ferrous iron and arsenite, leading to the coprecipitation of both [4]. Therefore, understanding factors that influence the competitiveness, diversity and role of these organisms is an essential step in the development of bioremediation systems treating arsenic contaminated environments.

Certain bacterial strains are able to use arsenite as an electron donor. By gaining energy, as well as removing the more toxic arsenic species, such bacteria may gain an advantage over other microorganisms [5]. Arsenite oxidase, the enzyme catalysing  $\text{As(III)}$ -oxidation, has been well characterised in several bacterial strains [6-11]. An important group of  $\text{As(III)}$ -oxidising bacteria belong to the *Thiomonas* genus, and are ubiquitous in arsenic-contaminated environments [12-15]. *Thiomonas* strains are able to gain energy from the oxidation of reduced inorganic sulphur compounds (RISCs) [16], and are defined as facultative chemolithoautotrophs which grow optimally in mixotrophic media containing RISCs and organic supplements. These bacteria are also capable of organotrophic growth [17]. The original description com-

prised *Thiomonas cuprina*, *T. intermedia*, *T. perometabolis* and *T. Thermosulfata* [17,18]. *Thiomonas perometabolis* was isolated from soil at a building site in Los Angeles, U.S.A., as *Thiobacillus perometabolis* [19]. It was differentiated from *Thiobacillus intermedius* (now *T. intermedia*, the type species of the genus) as it was apparently unable to grow autotrophically. However, Katayama-Fujimura and Kuraiishi [20] have since suggested that this is not true. Recently described species include *Thiomonas arsenivorans* [21] and the *Thiomonas* strains 3As [12], Ynys1 [22] and WJ68 [14]. *Thiomonas* sp. 3As was obtained from the Carnoules mine tailings, Southern France [12]. It was shown that this bacterium could gain energy from the oxidation of arsenic. The presence of carboxysomes and the detection of the *cbbSL* genes encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, led the authors propose that this strain may be able to fix  $\text{CO}_2$ . *T. arsenivorans* was isolated from another arsenic-rich mine residue at the Cheni former gold mine, Limousin, France [21]. The Cheni site is not very acidic ( $\text{pH} \sim 6.0$ ), but is highly contaminated with arsenic ( $6.0 \text{ mg g}^{-1}$  in the solid phase and  $\sim 1.33 \text{ mM}$  in the liquid phase) [23]. *T. arsenivorans* has been shown to oxidise arsenic and ferrous iron, and is able to grow autotrophically using arsenic as the sole energy source [21]. Strain Ynys1 was isolated from ferruginous waters which have been draining from an adit since the closure of several coal mines near to the village of Ynysarwed, Wales, U.K. [22]. The waters were of relatively neutral pH ( $\text{pH} 6.3$ ) with elevated iron loading ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) and have led to significant pollution of the area [22]. Strain WJ68 was the dominant isolate obtained from effluent draining all three of the compost bioreactors of a pilot-scale bioremediation plant receiving water from the Wheal Jane tin mine, Cornwall, U.K. [14]. Both WJ68 and Ynys1 are known to oxidise ferrous iron, while WJ68 has been shown to oxidise arsenite [15].

These five strains are interesting in terms of arsenic metabolism: *T. arsenivorans*, WJ68 and 3As are able to oxidise  $\text{As(III)}$ , while Ynys1 and *T. perometabolis* are not. Moreover, *T. arsenivorans* and 3As present interesting physiological traits, in particular that these strains are able to use  $\text{As(III)}$  as an electron donor. However, differences between *Thiomonas* strains in the way they have adapted and respond to arsenic have never been studied further. The connection between carbon and arsenic metabolism in these strains, particularly inorganic carbon assimilation and arsenite as energy source, has never been compared. Therefore, analysis was undertaken to examine these physiological aspects in these five *Thiomonas* strains.

## Results

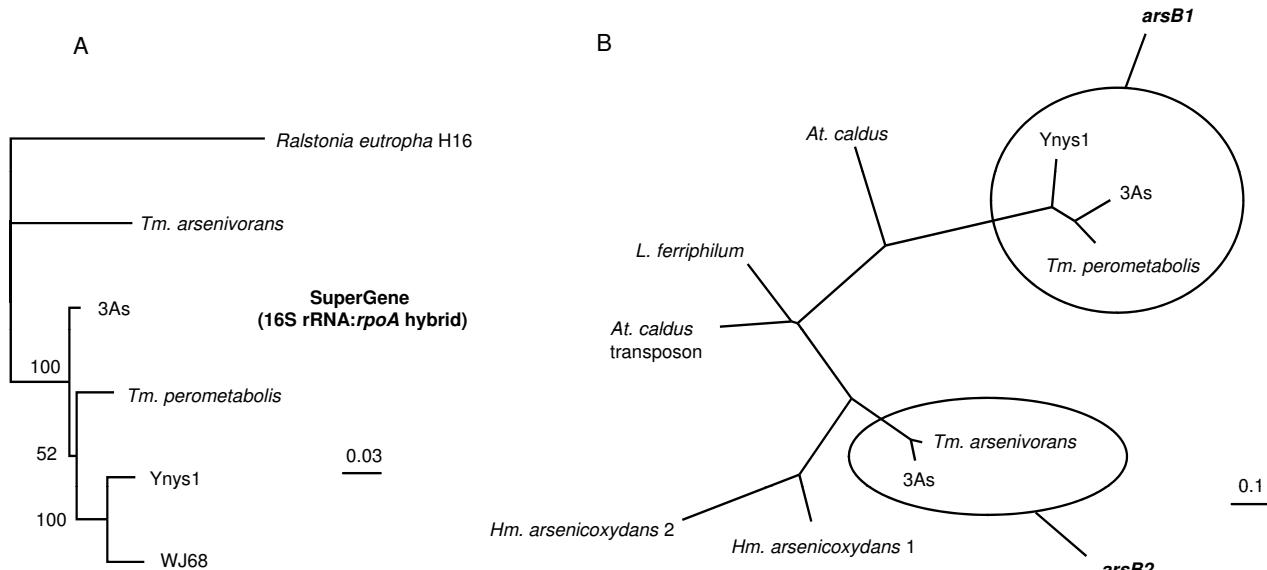
### Phylogenetic, phenotypic and genotypic analyses of the five *Thiomonas* strains

Phylogenetic analyses of amplified 16S rRNA and *rpoA* gene products confirmed the occurrence of two distinct monophyletic groups as had been suggested previously [15]. SuperGene analysis (Figure. 1A) was performed using concatenated 16S rRNA and *rpoA* gene sequences of each strain. These results placed *T. perometabolis* with WJ68 and Ynys1. Along with *Thiomonas* sp. 3As, these strains grouped together in Group I, while *T. arsenivorans* was part of Group II.

Various tests were carried out to examine the physiological response of the five strains to arsenic. This was coupled with a PCR-based approach to determine the presence of genes involved in arsenic metabolism. In agreement with previous data, strains 3As, WJ68 and *T. arsenivorans* oxidised arsenite to arsenate in liquid media whereas *T. perometabolis* and Ynys1 did not (Table 1). The *aoxAB* genes encoding the arsenite oxidase large and small subunits of *Thiomonas* sp. 3As and *T. arsenivorans* have previously been characterised [12,24]. Positive PCR results using primers which targeted a region of the *aoxAB* genes were obtained with DNA from all strains except Ynys1 and *T.*

*perometabolis*. The *aoxAB* genes of WJ68 were much more divergent than those of *T. arsenivorans* and 3As (data not shown). This is in agreement with previous findings showing that the *aoxB* gene of WJ68 groups neither with *T. arsenivorans* nor the Group I thiomonads [10], (Quéméneur, personal communication). The inability of *T. perometabolis* and Ynys1 to oxidise arsenite further implied that the *aox* operon was absent in these strains.

The MIC of As(III) for strains 3As, WJ68 and *T. arsenivorans* was 10 mM, higher than for strains Ynys1 and *T. perometabolis* (Table 1). Additionally, strain Ynys1 was more sensitive to As(V) than the other strains. Arsenic resistance in bacteria is in part due to the expression of *aox* genes but also of the *ars* arsenic-resistance genes [8]. Among these, *arsC* encodes an arsenate reductase and *arsA* and *arsB* encode an arsenite efflux pump. Analysis of the *Thiomonas* sp. 3As genome (Arsène-Ploetze & Bertin, unpublished) revealed the presence of two copies of the *arsB* gene, denoted *arsB1* and *arsB2*. These genes were found to be distantly related, sharing just 70.2% sequence identity. In order to compare the occurrence, copy number and type of *ars* genes present in the different *Thiomonas* strains, PCR amplifications using generic *arsB* primers were performed. As expected, RFLP and sequence analysis confirmed the



**Figure 1**  
**Phylogenetic dendrogram of the SuperGene construct of both the 16S rRNA and *rpoA* genes (A) of the *Thiomonas* strains used in this study.** *Ralstonia eutropha* H16 served as the outgroup. Numbers at the branches indicate percentage bootstrap support from 500 re-samplings for ML analysis. NJ analyses (not shown) produced the same branch positions in each case. The scale bar represents changes per nucleotide. (B) Phylogenetic dendrogram of the *arsB* genes of the *Thiomonas* strains used in this study and some other closely-related bacteria. Both ML and NJ (not shown) analysis gave the same tree structure. The scale bar represents changes per nucleotide. Sequences obtained using the *arsB1*- and *arsB2*-specific internal primers were not included in the analysis as the sequences produced were of only between 200 – 350 nt in length.

**Table 1: Summary of physiological and genetic data obtained for the *Thiomonas* strains used in this study.**

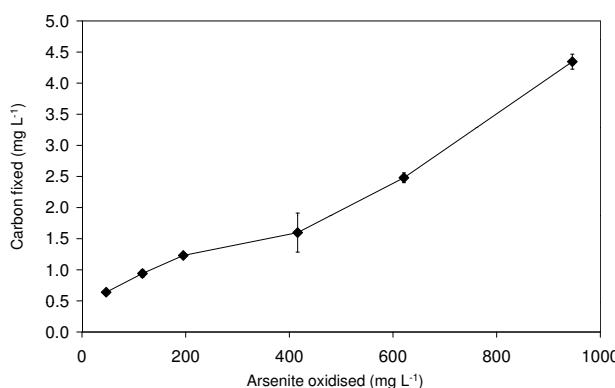
<i>Thiomonas</i> strains	Arsenic-related phenotype/genotype				Growth with different electron donors <sup>c</sup>				Influence of As(III) on final cell concentration <sup>d</sup>	
	As(III) Oxidation	MIC (mM)	Motility <sup>a</sup>	Effect of arsenite on strain motility <sup>b</sup>	PCR amplification of arsenic-related genes	As(II) <sup>e,f</sup>	YE + As(II) <sup>f</sup>	YE <sup>f</sup>	YE + S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-e</sup>
	As(III)	As(V)		aoxAB	arsB1	arsB2		YE 0.1 g L <sup>-1</sup>	YE 0.2 g L <sup>-1</sup>	
3As	+	10	100	2.9	/	+	+	+	-	(69%)
Ynys	-	5	12.5	5.6	- (35%)	-	+	-	-	(67%)
WJ68	+	10	> 100	38.7	+ (6%)	+	+	-	nd	nd
<i>Tm. arsenivorans</i>	+	10	100	4.5	+ (24%)	+	-	++	+++	/
<i>Tm. perrometabolis</i>	-	5	> 100	0	/	-	+	-	nd	nd

<sup>a</sup> Diameter (mm) of swimming ring formed on 0.3% agar plates after 72 h incubation expressed as a difference with non motile strains (forming colonies of < 3 mm diameter); <sup>b</sup>Motility was tested in the presence of 1.33 mM of arsenite; "+" indicates a diameter of swimming ring greater than in absence of arsenite, "-" a smaller one and "/" no change. <sup>c</sup>Basel medium (MCSM or m126) amended with either yeast extract (YE), thiosulfate or arsenite or combinations thereof: <sup>d</sup>5.33 mM in case of 3As, WJ68, and *Tm. arsenivorans*, 2.67 mM in case of Ynys and *Tm. perrometabolis*. <sup>e</sup>Growth is expressed as an increase of colony forming units (cfu) observed after 10 days; -, no increase; <sup>f</sup>Tested with 0.1, 0.2, 0.3% or 0.5% YE in absence of As(III), with 0.1, 0.2 or 0.3% YE and 1.3 mM of As(III), or with 0.3% YE and 2.6 mM As(III), <sup>g</sup>1.33 mM As(III) in MCSM. nd: no data.

presence of the *arsB1* and *arsB2* genes in strain 3As (Table 1). In contrast, only the *arsB1* gene could be detected using DNA from *T. perometabolis*, Ynys1 and WJ68, even when internal primers specific for the *arsB2* gene were used. Conversely, only the *arsB2* gene was detected in *T. arsenivorans*.

The phylogeny of the *arsB1* and *arsB2* genes was analysed, excluding the sequences obtained using the *arsB2* internal primers that were too short. The *arsB2* gene sequence for strain 3As was taken directly from the annotated genome (Arsène-Ploetze & Bertin, unpublished). The data showed that while they are all related to the *arsB* genes of *Leptospirillum* spp. and *Acidithiobacillus caldus*, the type 1 and type 2 genes formed two very distinct clades and have clearly diverged at an evolutionarily distant point in time (Figure. 1B).

The motility of *Herminiimonas arsenicolydans*, an arsenic-oxidising bacterium is greater in the presence of arsenite [25]. Motility tests revealed that the five *Thiomonas* strains reacted differently to the metalloid (Table 1). Strain *T. perometabolis* was found to be non-motile irrespective of arsenite concentrations. Among the motile strains, three distinct phenotypes were observed: those for whom motility was not affected by arsenite concentration (strain 3As); those who showed increased motility with increasing arsenite concentrations (strains *T. arsenivorans* and WJ68) and those who showed decreased motility with increasing arsenite concentration (Ynys1). WJ68 was three to four times more motile than all of the other strains. A concentration of 2.67 mM arsenite appeared to have an inhibitory effect on *T. arsenivorans* and WJ68 motility (data not shown).



**Figure 2**  
**Carbon fixed as a product of As(III) oxidised by *T. arsenivorans*.** Error bars, where visible, show standard deviation;  $n = 3$  for each data point.

All the physiological and genetic analyses revealed that the response to arsenic differed in the five *Thiomonas* strains; some of these differences were correlated with differences in the genetic content.

#### As(III) as an energy source, and the fixation of carbon dioxide

Only *T. arsenivorans*, 3As and WJ68 were able to grow in basal media with yeast extract as the sole energy source (Table 1). During these growth experiments, soluble sulfate concentrations remained the same or decreased slightly (data not shown), indicating that energy was gained from the oxidation of compounds other than any trace RISCs in the yeast extract, most probably organic carbon. These observations suggest that all strains except Ynys1 and *T. perometabolis* are organotrophic. All strains were able to grow in the presence of YE and thiosulfate (Table 1). In these thiosulfate-amended cultures, sulfate concentrations increased following incubation (data not shown), indicating that thiosulfate had been oxidised. This suggests that all strains were able to use this RISC as an energy source and are therefore chemolithotrophic. In all cases, greater growth occurred in thiosulfate-amended cultures, suggesting that mixotrophic conditions are optimal for the growth of these strains. It was however observed that *T. arsenivorans* grew better in MCSM liquid medium, whereas *T. perometabolis* and Ynys1 grew better in m126 medium (3As and WJ68 grew equally well in both; data not shown). MCSM contains 2 times less thiosulfate and suggests that the optimal thiosulfate concentration is lower in the case of *T. arsenivorans*.

Only *T. arsenivorans* was able to grow in basal media without yeast extract with either thiosulfate or arsenite as the sole energy source (Table 1). Although direct cell enumeration of *T. perometabolis* cultures was not possible due to its propensity to form flocs during growth, no growth, floccular or otherwise, was observed in the YE-free media. The growth of *T. arsenivorans* was stimulated by 1.33 mM As(III) in presence of 0.1 g L⁻¹ yeast extract, but this positive effect was no longer detected in presence of 0.2 g L⁻¹ yeast extract. The ability of *T. arsenivorans* to grow autotrophically using As(III) as the sole energy source was confirmed by the observation of increasing quantities of carbon fixed as more As(III) was oxidised (Figure. 2). This demonstrated that *T. arsenivorans* was able to use energy gained from the oxidation of As(III) to fix inorganic carbon. In contrast, strain 3As was unable to fix inorganic carbon under the same conditions (in MCSM), as 1.33 mM As(III) was found to inhibit growth in presence of 0.1 or 0.2 g L⁻¹ yeast extract (Table 1), and this strain was unable to grow in presence of As(III) as the sole energy source.

Figure 2 shows an essentially linear relationship between carbon fixed and arsenic oxidised, corresponding to 3.9

**Table 2: Arsenic-induced or repressed proteins in *T. arsenivorans* and *Thiomonas* sp. 3As.**

Functional class	Metabolic pathway	Gene	Protein	Induction/repression by As <sup>a</sup>	
				<i>T. arsenivorans</i>	<i>Thiomonas</i> sp. 3As
Energy and carbon metabolism	Calvin Cycle	<i>rbcL</i>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	+	-
		<i>cbbFCI</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	+	0
		<i>cbbAI</i>	Fructose biphosphate aldolase	0	-
	TCA cycle/reductive carboxylate cycle	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase, specific for NADP+	+	0
		<i>aceB</i>	Malate synthase A	+	0
	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	<i>gltA</i>	Citrate synthase	+	0
		<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	0	+
		/	Tartrate dehydrogenase/decarboxylase (TDH) (D-malate dehydrogenase [decarboxylating])	0	+
Glycolysis/gluconeogenesis	<i>ppsA</i> <i>aceE</i> <i>lpdA</i> <i>eno2</i>	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvate synthase	+	-
		<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	+	-
		<i>lpdA</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase (Pyruvate dehydrogenase E3 component)	+	0
		<i>eno2</i>	Enolase	0	-
	Thiosulfate oxydation	/	Putative sulfur oxidation protein SoxB	0	-
Cellular processes, transport and binding proteins	Arsenic resistance	<i>arsA2</i>	Arsenical pump-driving ATPase	+	0
		<i>arsC1</i>	Arsenate reductase	0	+
	High temperature resistance	<i>hidD</i>	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	+	0
	General stress	<i>groL</i>	GroEL, 60 kDa chaperonin	+	0
	Other stresses	<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	0	-
	Twitching/motility/secretion	/	Putative methyl-accepting chemotaxis protein	0	-
		/	Putative type IV pilus assembly protein PilM	0	-
		/	Putative cell division protein	0	-
	DNA metabolism, transcription and protein synthesis	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	+	-
		<i>pnp</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	+	-
		<i>fusA</i>	Elongation factor G (EF-G)	+	0
		<i>tufA</i>	Elongation factor Tu	+	0
		<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	+	0

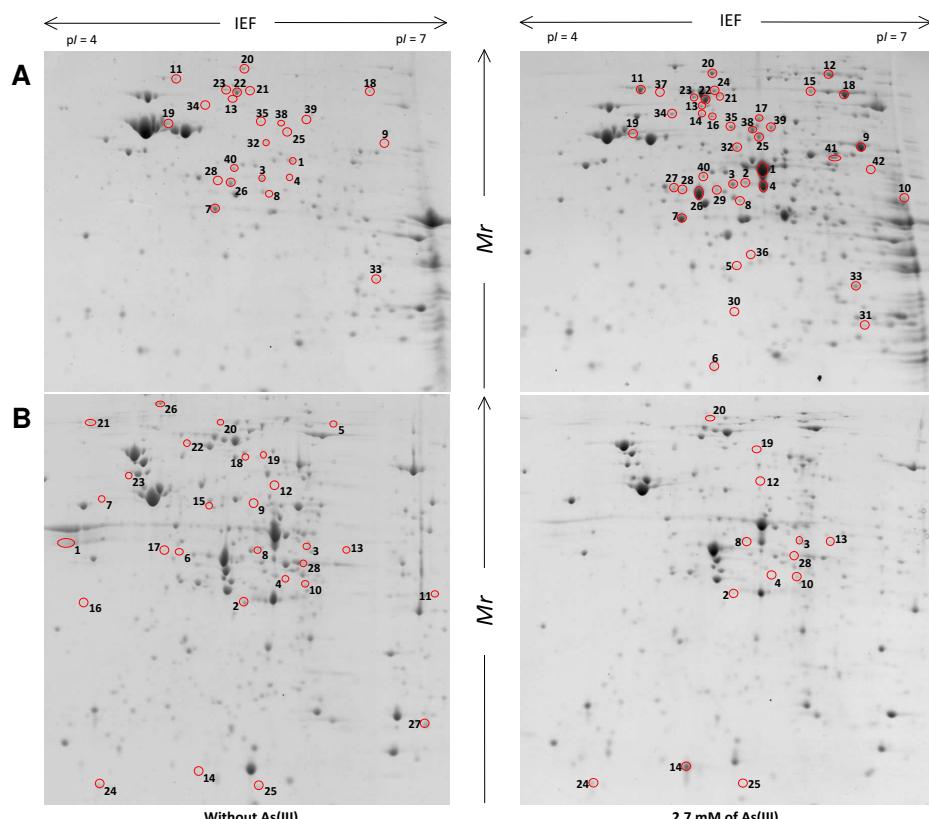
<sup>a</sup> + and -: these proteins are more or less abundant in the presence of As(III), respectively. 0: no difference observed (for details, see Additional File 1).

mg C fixed for 1 g of As(III) oxidised, i.e. 0.293 mg C fixed mM<sup>-1</sup> As(III). It requires 40 J to produce 1 mg of organic carbon cellular material from CO<sub>2</sub> [26]. The energy produced from the oxidation of As(III) with O<sub>2</sub> is 189 J mMol<sup>-1</sup> [27]. As a consequence, if 100% of this energy was used for carbon fixation, 4.73 mg C would be fixed for 1 mM As(III) oxidised. Thus, in this experiment, 6% of the energy available from arsenic oxidation was used for carbon fixation. This result is in accordance with the 5 to 10% range of efficiency for carbon fixation by various autotrophic bacteria [26].

#### **Enzymes involved in carbon metabolism and energy acquisition are expressed differently in *T. arsenivorans* and 3As in response to arsenic**

Protein profiles expressed in MCSM or m126 media, in the presence and absence of arsenic were compared in

each strain (Figure 3, Table 2 and see Additional file 1). In both strains, arsenic-specific enzymes (ArsA2 in *T. arsenivorans*, ArsC1 in 3As) were more abundant in the presence of As(III), suggesting that a typical arsenic-specific response occurred in both strains. ArsA2 is part of the efflux pump with ArsB2 and is encoded by the *ars2* operon. Moreover, expression of a putative oxidoreductase (THI3148-like protein) was induced in the presence of arsenic. This protein is conserved in *At. caldus*, with 90% amino-acid identity (Arsène-Ploetze & Bertin, unpublished). The *At. caldus* gene encoding this THI3148-like protein is embedded within an *ars* operon. This protein is also conserved in more than 56 other bacteria, for example in *Mycobacterium abscessus* (51% identity) and *Lactobacillus plantarum* (48% identity). In these two cases the corresponding gene was also found in the vicinity of *ars* genes.



**Figure 3**

**Differential proteomic analysis in *T. arsenivorans* and *Thiomonas* sp. 3As strains, in response to As(III).** On the gel presented are extracts obtained from (A) *T. arsenivorans* or (B) *Thiomonas* sp. 3As cultivated in the absence (left) or in the presence (right) of 2.7 mM As(III). Spots that are circled showed significant differences of accumulation pattern when the two growth conditions were compared. Protein sizes were evaluated by comparison with protein size standards (BenchMark™ Protein Ladder, Invitrogen).

The expression of several proteins involved in other metabolic pathways changed, suggesting that in the presence of arsenic, the general metabolism of *T. arsenivorans* and 3As was modified. Indeed, enzymes involved in glyoxylate metabolism were more abundant in the presence of arsenic, suggesting that expression of such proteins is regulated in response to arsenic in both strains. However, several changes observed were clearly different between both strains. In *T. arsenivorans*, two proteins involved in CO<sub>2</sub> fixation (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (RuBisCo) and fructose-1,6-biphosphatase) were more abundant when cells were grown in the presence of arsenic, whereas in *Thiomonas* sp. 3As, such proteins were less abundant in the presence of As(III). In addition to these proteins, it was observed that enzymes involved in major carbon metabolism (glycolysis, neoglucogenesis) or energy metabolism (thiosulfate oxidation, oxidative phosphorylation) were less abundant in 3As in the presence of As(III). This observation correlated with the phenotypic observation that the strain 3As grew better in the absence of arsenic (Table 1).

## Discussion

Two groups could be distinguished within the *Thiomonas* strains studied: Group I comprises all the strains in this study except *T. arsenivorans*, which is part of a second group, Group II. As described by Moreira and Amils [17], all of the strains grew better in mixotrophic media containing both thiosulfate and organic supplements, and used RISCs as an energy source. This suggests that lithotrophy is a general characteristic of the *Thiomonas* genus. In contrast, neither strain Ynys1 nor *T. perometabolis* could grow organotrophically in the absence of a reduced sulfur compound, suggesting that, despite previous findings, facultative organotrophy is not a general property of the *Thiomonas* genus. To improve our understanding of these important arsenic-resistant bacteria, several metabolic and genetic properties were investigated. It appears that much greater physiological differentiation regarding arsenic response was possible between these *Thiomonas* strains than may have been previously suggested. Clearly organisms that are phylogenetically close can differ greatly physiologically, in particular concerning specific metabolic traits such as the metabolism of arsenic. For example, the effects of arsenic on the motility of all strains appeared to be somewhat random, and cannot easily be related to any of the phylogenetic or physiological data obtained. It is worth noting that both *T. arsenivorans* and WJ68 strains exhibited increased motility in the presence of arsenic. This may indicate a potential energetic role of the element for these strains, as proposed for the arsenic-oxidising bacterium, *H. arsenicoxydans* [25].

Other physiological divergences concern arsenic resistance. Ynys1 and *T. perometabolis* were approximately twice

as sensitive to As(III) as the other strains. Moreover, the inhibitory effect of arsenite on Ynys1 motility suggests a greater susceptibility of this strain to the metalloid. This could be due to the absence of *aox* or *ars* genes. Indeed, these two strains are unable to oxidize As(III), probably as they lack *aox* genes. Moreover, *arsB2* genes were not detected in Ynys1 and *T. perometabolis*. Therefore, it is probable that these two strains have only a single set of arsenic resistance genes that can be expressed. Interestingly, WJ68 was found to be equally resistant to arsenic as these strains, yet no *arsB2* gene could be amplified by PCR. The same is true for *T. arsenivorans*, for which no *arsB1* gene was detected by PCR, yet it was again as resistant as those strains shown to possess both the *ars1* and *ars2* operons. One possible explanation is that WJ68 possesses two copies of the *ars1* operon and *T. arsenivorans* has two copies of the *ars2* operon. Alternatively, the higher resistance capacities of *T. arsenivorans*, *Thiomonas* sp. 3As, and WJ68, as compared to Ynys1 and *T. perometabolis* may be due to greater As(III) oxidation capacity of these strains.

The arsenic response observed in *T. arsenivorans* and 3As revealed that the proteins involved in arsenic resistance (*ars* genes) were more highly expressed in the presence of arsenic, as shown previously for *H. arsenicoxydans* [25,28], *Pseudomonas aeruginosa* [29] and *Comamonas* sp. [30]. Therefore, such a feature seems to be a common arsenic response. In *H. arsenicoxydans*, other proteins that were shown to be more abundant in the presence of arsenic were involved in oxidative stress, DNA repair and motility. In this study, such proteins (hydroperoxide reductase, methyl-accepting chemotaxis protein, PilM) were induced in *Thiomonas* sp. 3As whereas in *T. arsenivorans*, only general stress proteins were induced. These observations suggest that the response to the stress induced by arsenic involves different regulatory mechanisms in 3As and *T. arsenivorans*. Contrary to this arsenic-specific response, the other arsenic-regulated proteins identified in the *Thiomonas* strains did not share a similar expression pattern with other arsenic-resistant bacteria. Thus it appears that while there may be a common arsenic response between all the bacteria, the general metabolism may be differentially adapted to each environment from which these strains originated. In particular, *T. arsenivorans* has unique traits in terms of arsenic, carbon and energy metabolism that distinguish it from the other strains examined.

*Thiomonas arsenivorans* can grow autotrophically using either As(III) or thiosulfate as the sole energy source. Surprisingly, the differential protein expression analysis revealed that even in the presence of yeast extract, proteins involved in CO<sub>2</sub> fixation through the Calvin-Benson-Bassham cycle and enzymes involved in the glycolysis/neoglucogenesis were expressed. In addition, it was

shown in the present study that *T. arsenivorans* induces expression of carbon fixation-specific enzymes in the presence of arsenic. This observation was correlated with an increased CO<sub>2</sub> fixation efficiency when arsenic concentration increased. This suggests that an increase in *cbb* genes expression in the presence of arsenic improves its capacity to fix CO<sub>2</sub>. On the other hand, the opposite observation was seen with *Thiomonas* sp. 3As. Therefore, the proteomic results obtained from the present study suggest that these two *Thiomonas* strains react differently to their arsenic-contaminated environments. The other differences observed concern DNA metabolism, transcription and protein synthesis. It appears that, in the presence of arsenic, *T. arsenivorans* is still able to express proteins required for optimal growth whereas 3As is not.

## Conclusion

These observations revealed that carbon assimilation, energy acquisition and arsenic metabolism of these strains are linked. However, they do not share a common mechanism, since metabolisms required for growth and carbon assimilation are stimulated in *T. arsenivorans* in the presence of arsenic, but repressed in *Thiomonas* sp. 3As. Further work is needed to test if a common mechanism occurs to regulate carbon assimilation and arsenic response in other *Thiomonas* strains. However, to our knowledge, this is the first example of such a link between arsenic metabolism and carbon assimilation.

## Methods

### Culture media

All strains except *T. arsenivorans* were routinely cultured on m126 (modified 126 medium) gelled or liquid medium. Medium m126 contains: (g L<sup>-1</sup>) yeast extract (YE; 0.5); Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (5.0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.5); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4.5); MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.1); (NH<sub>4</sub>)Cl (0.3), adjusted to pH 5.0 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> prior to sterilisation. *T. arsenivorans* was routinely cultured on a modified MCSM medium (MCSM) [31] with vitamins and trace elements omitted, yeast extract added to a final concentration of 0.5 g L<sup>-1</sup> and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> to a final concentration of 2.5 g L<sup>-1</sup>. Variations of these media included omitting yeast extract and/or thiosulfate. Where no yeast extract was included, trace elements were added, as described previously [32]. Where required, the media were gelled by the addition of 12 g L<sup>-1</sup> agar (final concentration). Arsenite (As(III)) and arsenate (As(V)) were added to media to the desired concentration from sterile stocks of 667.4 mM of the metalloid ion in ddH<sub>2</sub>O, from NaAsO<sub>2</sub> (Prolabo) and Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Prolabo) salts, respectively.

### Physiological tests

Minimum inhibitory concentration (MIC) experiments were performed using gelled media, amended with a range of concentrations of either arsenite or arsenate.

Concentrations of 10, 5.0, 2.25, 1.25 and 0 mM As(III) or 100, 50, 25, 12.5, 6.3 and 0 mM As(V) were tested at 30°C for up to 10 days. The ability of each strain to oxidise arsenite was tested in triplicate, in liquid media amended with 0.67 mM arsenite. Detection of As(III) and As(V) was performed by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) as described by Weeger *et al.* [33]. To test the ability of each strain to grow in the absence of a reduced inorganic sulfur source or organic carbon source, pre-cultures grown in standard media were harvested by centrifugation at 10 K g for 10 min, washed and resuspended in a basal medium (m126 medium with no thiosulfate or yeast extract). These were then used to inoculate the test liquid media and incubated at 30°C for 10 days. Soluble sulfate concentrations were determined turbidimetrically by the formation of insoluble barium sulfate, as described by Kolmert *et al.* [34]. Bacterial growth in media containing YE was assessed using optical density at 600 nm. Viable cell counts were used to measure growth in the media lacking YE, as described by Miles and Misra [35] using appropriate gelled media, as the autotrophic growth yield would be much lower. Where YE was omitted, the media contained either the normal concentration of thiosulfate or 5.33 mM arsenite (or 2.67 mM for those strains sensitive to arsenite) as an electron donor. In the case of arsenite-amended media, pre-cultures were grown in the presence of 2.67 mM arsenite.

To determine autotrophic growth yield as a product of As(III) oxidised, triplicate cultures were grown in liquid MCSM without YE or thiosulfate containing either 0.66 or 1.33 mM As(III), at 25°C in static conditions. To test concentrations greater than 1.33 mM, initial cultures containing 1.33 mM As(III) were inoculated. As soon as the As(III) had been oxidised, more As(III) was added from a concentrated (0.13 M) stock solution to a final concentration of 1.33 mM. Once this had been oxidised, the process was repeated until the desired total quantity of As(III) had been added. The oxidation of As(III) to As(V) was analysed as described by Battaglia-Brunet *et al.* [31]. The pH was adjusted to pH 6.0 using a sterile NaOH solution before each As(III) addition. Once all of the As(III) had been oxidised, each culture was centrifuged at 10 kg for 15 min and the pellet resuspended in 10 mL MCSM. The total organic carbon concentration of this suspension was analysed using an OI ANALYTICAL 1010 apparatus according to the AFNOR NF EN 1484 method. The influence of As(III) on final cell concentration in the presence of an organic substrate was determined with strains 3As and *T. arsenivorans* in MCSM complemented with 0.1 or 0.2 g L<sup>-1</sup> yeast extract. Final cell concentration was determined by measuring optical density at 620 nm.

Strain motility was assessed using growth media supplemented with 0.3% agar as described previously [36].

Three separate cell cultures of each strain were analysed in triplicate.

#### Differential protein expression analysis

*T. arsenivorans* and *Thiomonas* sp. 3As strains were grown in MCSM and m126, respectively, with or without 2.7 mM As(III). Cells were harvested by centrifugation (7 K<sub>g</sub>, 10 min, 4°C). Cell lysis was performed as described previously [37]. Proteins were precipitated using the 2-D Clean-up kit (Amersham Biosciences) and resuspended in rehydration buffer (364 g L<sup>-1</sup> thiourea, 1000 g L<sup>-1</sup> urea, 25 g L<sup>-1</sup> CHAPS, 0.6% (v/v) IPG buffer Pharmalyte, 10 g L<sup>-1</sup> DTT and 0.01% (w/v) bromophenol blue). Protein concentration was determined using the 2-D Quant kit (Amersham Biosciences).

Three hundred µg of this extract were loaded onto an 18 cm pH 4–7 IPG strip using the cup-loading technique (manifold, GE Healthcare Biosciences, Australia). IEF was conducted using the IPGPhor system (10 min at 150 V, 10 min at 500 V, 10 min at 1,000 V, 1.5 h at 4,000 V, and 4 to 5 h at 8,000 V, total = 50 kWh; GE Healthcare Biosciences, Australia). The second dimension was performed on 11.5% SDS-PAGE, using the EttanDAlt system (GE Healthcare Biosciences, Australia). Gels were stained with Colloidal Brilliant Blue (CBB), and digitised using an Image Scanner (Amersham Pharmacia) and the LabScan software (v 3.0, Amersham Pharmacia Biotech). Differential protein expression analysis was performed using the ImageMaster 2D platinum software (v. 6.01, GE Healthcare Biosciences, Australia), as previously described [37]. Only spots with a Student's-t value greater than 2 (P value less than 0.05) and ratio greater than 2 were analysed. The selected spots were cut from the 2D-gel. Destaining, reduction/alkylation steps by the liquid handling robot QuadZ215 (Gilson International, France) and analyses by MALDI-TOF were performed as previously described [37]. Tryptic mass searches retained only data with up to one missed tryptic cleavage and optional methionine oxidation, with mass accuracy limited to 50 ppm. If necessary, unidentified proteins were subjected to Nano LC-MS/MS analysis. The resulting digest solution was diluted 1:4 into Nano HPLC solvent A (97.9% H<sub>2</sub>O, 2% ACN and 0.1% (v/v) HCOOH). The digested proteins were analysed

using a CapLC capillary LC system (Waters, Altrincham, UK) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Q-TOF Micro, Waters). Diluted sample (5 µL) was first loaded, concentrated and cleaned up onto a C18 PepMap precolumn cartridge (LC Packings) and then separated on-line by the analytical reversed-phase capillary column (NanoEase C18, 75 µm i.d., 15 cm length; Waters) with a 200 µL min<sup>-1</sup> flow rate. The gradient profile used consisted of a linear gradient from 97% A (97.9% H<sub>2</sub>O, 2% ACN and 0.1% (v/v) HCOOH) to 95% B (98% ACN, 1.9% H<sub>2</sub>O and 0.1% (v/v) HCOOH) for 45 min followed by a linear gradient to 95% B for 3 min. Internal calibration was assumed by the Lockspray module (Waters) that switches to a reference source (leucine enkephalin M<sup>2+</sup> = 556.2551 m/z) every 10 seconds during the acquisition run. The spray system (liquid junction) was used at 3.6 kV. Mass data acquisitions were piloted by MassLynx 4.0 software (Waters). Nano-LC-MS/MS data were collected by data-dependent scanning, that is, automated MS to MS/MS switching. Fragmentation was performed using argon as the collision gas and with a collision energy profile optimised for various mass ranges of ion precursors. Four ion precursors were allowed to be fragmented at the same time. Mass data collected during a NanoLC-MS/MS analysis were processed automatically with the ProteinLynx Process (Waters) module. Data analysis was performed with Mascot (Matrix Science Ltd., London, U.K.) against the in-house *Thiomonas* sp. 3As protein database with carbamidomethylation (Cys), oxidation (Met), 0.25 Da mass error and one miss cleavage. All identifications were incorporated into the "InPact" proteomic database developed previously <http://inpect.u-strasbg.fr/~db/>[38].

#### Molecular microbiology

DNA was extracted and purified from liquid cultures of pure isolates using the Wizard genomic DNA extraction kit (Promega, U.S.A.). The 16S rRNA genes were amplified by PCR using the 27f:1492r primer pair [39]. A 743 nt-long fragment of the *rpoA* gene of each organism was amplified using the *rpoAf2a*:*rpoAr2a* primer pair (GGB-GTGSTCCACGARTAY and GCRAGSACTTCCTTRATYTC, respectively). The *aoxAf*:*aoxB* primer pair (TGYACCCA-YATGGGMTGYCC and CSATGGCTTGTCRGTSASGTA,

**Table 3: PCR target and GenBank Accession IDs for strains used in this study.**

Strain	16S	<i>rpoA</i>	<i>aoxA</i>	<i>arsB1</i>	<i>arsB2</i>
3As	<a href="#">AM492684<sup>a</sup></a>	<a href="#">EU339226</a>	<a href="#">EU339209</a>	<a href="#">EU339214</a>	<a href="#">EU339217</a>
YnysI	<a href="#">AF387302<sup>a</sup></a>	<a href="#">EU339223</a>	n/d	<a href="#">EU339216</a>	n/d
WJ68	<a href="#">AY455805<sup>a</sup></a>	<a href="#">EU339224</a>	<a href="#">EU339213</a>	n/s	n/d
<i>T. arsenivorans</i>	<a href="#">AY950676<sup>a</sup></a>	<a href="#">EU339231</a>	<a href="#">EU304260<sup>a</sup></a>	n/d	<a href="#">EU339222</a>
<i>T. perometabolis</i>	<a href="#">AY455808<sup>a</sup></a>	<a href="#">EU339230</a>	n/d	<a href="#">EU339215</a>	n/d

<sup>a</sup> Accession IDs from other studies; n/d, no data; n/s, sequence not submitted: the *arsB1* and *arsB2* sequences obtained with the internal primers were short and therefore were not submitted to the GenBank sequence repository.

respectively) were used to amplify 1451 nt of the *aoxA* and *aoxB* genes, including the short (~27 nt) intragenic region. The generic *arsBf*:*arsBr* primer pair (GGTGTGAA-CATCGCTGGAAAYGCNAC and CAGGCCGTACACCAC-CAGRTACATNCC, respectively) were designed to amplify between 740 and 760 bp of both copies of the *arsB* gene in all *Thiomonas* strains. Following subsequent analysis, *arsB1*- and *arsB2*-specific internal forward and reverse primers were designed. The *arsB1i2f*:*arsB1i2r* primer pair (TGGCGTTCTGATGGCNGCGG and CACCG-GAACACCAGCGSRTCYTTRAT, respectively) amplified 268 bp of the *arsB1* gene, whereas the *arsB2i2f*:*arsB2i1r* primer pair (TGGCCGTGGCCTGTYGCNTIYYT and ACCCAGCCAATACGAAAGGTNGCNGGRTC, respectively) amplified 417 bp of the *arsB2* gene. Virtual digestions of the *arsB1* and *arsB2* genes of strain 3As suggested that the two genes should be differentiated by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using the restriction enzyme *Rsa*I.

#### Phylogenetic analysis

Sequences were aligned using the ClustalX alignment programme [40]. SuperGene analysis was performed by concatenating the 16S rRNA and *rpoA* gene sequences of each organism, to improve the phylogenetic analysis as proposed recently [41]. Neighbour-Joining trees were constructed using ClustalX, with bootstrap values determined from 1000 replications. Maximum likelihood (ML) trees were constructed using the PhyML algorithm [42]. The ModelGenerator programme [43] was used to select the optimal nucleotide substitution model for ML analysis. Bootstrap values were determined from 500 replications. A list of sequences generated during this study and their GenBank Accession IDs can be found in Table 3.

#### Authors' contributions

CGB carried out the physiological and molecular genetic studies and drafted the manuscript. MM carried out motility tests, analysed the proteomic data and helped to draft the manuscript. FBB performed the carbon fixation experiments. VK carried out the proteomic experiments. CL-G performed the mass spectrometry analyses. DL participated in physiological analyses. PB and FA-P conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and commented on the manuscript.

#### Additional material

##### Additional file 1

*MS (Maldi or MS/MS) identification results of arsenic-induced proteins in T. arsenivorans and Thiomonas sp. 3As. Protein profiles expressed in MCSM or m126 media, in the presence and absence of arsenic: detailed results of proteomic and mass spectrometry analyses.* Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-9-127-S1.xls]

#### Acknowledgements

*T. perometabolis* was obtained from the Pasteur Institute, Paris, France. The authors would like to thank Dr Violaine Bonnefoy and Dr Kevin Hallberg for providing the *Thiomonas* strains and their invaluable advice on all things *Thiomonas* and Dr Catherine Joulian for her help with functional gene primer design.

The study was financed by the ANR 07-BLAN-0118 project (Agence Nationale de la Recherche). CGB was supported by a grant from the University Louis-Pasteur of Strasbourg. MM was supported by a grant from ANR COBIAS project (PRECODD 2007, Agence Nationale de la Recherche). This work was performed within the framework of the research network "Arsenic metabolism in Prokaryotes" (GDR2909-CNRS).

#### References

1. Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, et al.: **Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues.** Environ Health Perspect 1999, **107**(7):593-597.
2. Hallberg KB, Johnson DB: **Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine.** Sci Total Environ 2005, **338**(1-2):53-66.
3. Oremland RS, Stoltz JF: **The ecology of arsenic.** Science 2003, **300**(5621):939-944.
4. Casiot C, Morin G, Juillot F, Brunel O, Personné JC, Leblanc M, Duquesne K, Bonnefoy V, Elbaz-Poulichet F: **Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoules creek, France).** Water Res 2003, **37**(12):2929-2936.
5. Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, Warelow TP, Ward SA, Santini JM: **Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes.** Environ Microbiol 2007, **9**(4):934-943.
6. Prasad KS, Subramanian V, Paul J: **Purification and characterization of arsenite oxidase from *Arthrobacter* sp.** Biometals 2009 in press.
7. Ellis PJ, Conrads T, Hille R, Kuhn P: **Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å.** Structure 2001, **9**(2):125-132.
8. Silver S, Phung LT: **Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic.** Appl Environ Microbiol 2005, **71**(2):599-608.
9. Muller D, Lièvremont D, Simeonova DD, Hubert JC, Lett MC: **Arsenate oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium.** J Bacteriol 2003, **185**(1):135-141.
10. Santini JM, Hoven RN van den: **Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26.** J Bacteriol 2004, **186**(6):1614-1619.
11. Lebrun E, Brugna M, Baymann F, Muller D, Lièvremont D, Lett MC, Nitschke W: **Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme.** Mol Biol Evol 2003, **20**(5):686-693.
12. Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, Muller D, Lett MC, Bonnefoy V: **Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study.** Environ Microbiol 2008, **10**:228-237.

13. Brunel O, Personné JC, Casiot C, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, Mahler BJ, Le Flèche A, Grimont PA: **Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France).** *J Appl Microbiol* 2003, **95**(3):492-499.
14. Johnson DB, Hallberg KB: **Biogeochemistry of the compost bio-reactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system.** *Sci Total Environ* 2005, **338**(1-2):81-93.
15. Coupland K, Battaglia-Brunet F, Hallberg KB, Dector MC, Garrido F, Johnson DB: **Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role of novel *Thiomonas* spp.** In *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution* Edited by: Tzezos AHM, Remondaki E, Zografou, Greece: National Technical University of Athens; 2004:639-646.
16. Katayama Y, Uchino Y, Wood AP, Kelly DP: **Confirmation of *Thiomonas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomonas* Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2006, **56**(Pt 11):2553-2557.
17. Moreira D, Amils R: **Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov.** *Int J Syst Bacteriol* 1997, **47**(2):522-528.
18. Kelly DP, Uchino Y, Huber H, Amils R, Wood AP: **Reassessment of the phylogenetic relationships of *Thiomonas cuprina*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, **57**(Pt 11):2720-2724.
19. London J, Rittenberg SC: ***Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic *Thiobacillus*.** *Arch Microbiol* 1967, **59**(1):218-225.
20. Katayama-Fujimura Y, Kuraishi H: **Emendation of *Thiobacillus perometabolis* London and Rittenberg 1967.** *Int J Syst Bacteriol* 1983, **33**:650-651.
21. Battaglia-Brunet F, Joulian C, Garrido F, Dector MC, Morin D, Coupland K, Barrie Johnson D, Hallberg KB, Baranger P: **Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov.** *Antonie van Leeuwenhoek* 2006, **89**(1):99-108.
22. Hallberg KB, Johnson DB: **Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters.** *Hydrometallurgy* 2003, **71**: 39-148.
23. Bodénan F, Baranger P, Piantone P, Lassin A, Azaroual M, Gaucher E, Braibant G: **Arsenic behaviour in gold-ore mill tailing, Massif Central, France: hydrogeochemical study and investigation of in situ redox signatures.** *Applied Geochemistry* 2004, **19**: 1785-1800.
24. Quéméneur M, Heinrich-Salmeron A, Muller D, Lièvremont D, Jauzein M, Bertin PN, Garrido F, Joulian C: **Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**(14):4567-4573.
25. Muller D, Médigue C, Koehler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsène-Ploetz F, Carapito C, et al.: **A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments.** *PLoS Genet* 2007, **3**(4):e53.
26. Shock EL, Helgeson HC: **Calculation of the thermodynamic and transport properties of aqueous species at high pressures and temperatures: correlation algorithms for ionic species and equation of state predictions to 5 kb and 1000°C.** *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1988, **52**(8):2009-2036.
27. Starkey RL: **Precipitation of Ferrie Hydrate by Iron Bacteria.** *Science* 1945, **102**(2656):532-533.
28. Carapito C, Muller D, Turlin E, Koehler S, Danchin A, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Bertin PN, Lett MC: **Identification of genes and proteins involved in the pleiotropic response to arsenic stress in *Caenibacter arsenoxydans*, a metalloresistant beta-proteobacterium with an unsequenced genome.** *Biochimie* 2006, **88**(6):595-606.
29. Parvatiyar K, Alsabbagh EM, Ochsner UA, Stegemeyer MA, Smulian AG, Hwang SH, Jackson CR, McDermott TR, Hassett DJ: **Global analysis of cellular factors and responses involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance to arsenite.** *J Bacteriol* 2005, **187**(14):4853-4864.
30. Zhang Y, Ma YF, Qi SW, Meng B, Chaudhry MT, Liu SQ, Liu SJ: **Responses to arsenite stress by *Comamonas* sp. strain CNB-I at genetic and proteomic levels.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 11):3713-3721.
31. Battaglia-Brunet F, Dector MC, Garrido F, Crouzet C, Morin D, Dekeyser K, Clarens M, Baranger P: **An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors.** *J Appl Microbiol* 2002, **93**(4):656-667.
32. Bryan CG, Hallberg KB, Johnson DB: **Mobilisation of metals in mineral tailings at the abandoned São Domingos copper mine (Portugal) by indigenous acidophilic bacteria.** *Hydrometallurgy* 2006, **83**(1-4):184-194.
33. Weeger W, Lièvremont D, Perret M, Lagarde F, Hubert J-C, Leroy M, Lett M-C: **Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment.** *BioMetals* 1999, **12**(2):141-149.
34. Kolmert Å, Wikström P, Hallberg KB: **A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures.** *J Microbiol Methods* 2000, **41**(3):179-184.
35. Miles AA, Misra SS: **Estimation of the bactericidal power of the blood.** *J Hyg (London)* 1938, **38**:732-749.
36. Bertin P, Benhabiles N, Krin E, Laurent-Winter C, Tendeng C, Turlin E, Thomas A, Danchin A, Brasseur R: **The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria.** *Mol Microbiol* 1999, **31**(1):319-329.
37. Weiss S, Carapito C, Cleiss J, Koehler S, Turlin E, Coppee J-Y, Heymann M, Kugler V, Stauffert M, Cruveiller S, et al.: **Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite-oxidizing strain *Herminiimonas arsenicoxydans* by proteomics data.** *Biochimie* 2009, **91**:192-203.
38. Bertin PN, Médigue C, Normand P: **Advances in environmental genomics: towards an integrated view of micro-organisms and ecosystems.** *Microbiology* 2008, **154**(Pt 2):347-359.
39. Lane DJ: **16S/23S sequencing.** In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* Edited by: Goodfellow ESM. New-York: John Wiley and Sons; 1991:115-175.
40. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: **The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(24):4876-4882.
41. Gadagkar SR, Rosenberg MS, Kumar S: **Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree.** *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2005, **304**(1):64-74.
42. Guindon S, Gascuel O: **A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood.** *Syst Biol* 2003, **52**(5):696-704.
43. Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, Naughton TJ, McLnerney JO: **Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified.** *BMC Evol Biol* 2006, **6**:29-47.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



Additional file 1. MS (Maldi or MS/MS) identification results of arsenic-induced proteins in *Tm. arsenivorans* and *Thiomonas* sp. 3As.

Strain	Functional class	Metabolic pathway	Spot Number	ratio +As versus -As <sup>a</sup>	CDS <sup>b</sup>	Gene	Protein	MspI	Score Mascot	Error (ppm)	% coverage
<i>Tm. arsenivorans</i>	Energy and carbon metabolism	Calvin Cycle	1	18.4	THI0135 <sup>c</sup>	<i>rbcL</i>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	53210/5.82	71	44	24
			2	>1000					100	37	24
			3	4.4					111	19	5
			4	122.9					90	53	23
			5	3.1					66	29	2
			6	6.4					39	88	8
		TCA cycle/reductive carboxylate cycle	7	2.8	THI0158 <sup>c</sup>	<i>cbbFC1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	39420/5.65	60	23	10
	Cellular processes, transport and binding proteins	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	8	2.6	THI1758 <sup>c</sup>	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase, specific for NADP+	45965/6.00	80	3	5
		Glycolysis/gluconeogenesis	9	3.3	THI3344 <sup>c</sup>	<i>aceB</i>	Malate synthase A	58162/6.33	78	45	7
			10	>1000	THI2710 <sup>c</sup>	<i>gltA</i>	Citrate synthase	48660/6.53	66	5	2
			11	7.5	THI2452	<i>ppsa</i>	Phosphoenolpyruvate synthase	86322/5.62	72	20	4
		Pentose and glucuronate interconversions	12	6.2	THI2680	<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	101171/6.36	138	5	4
			13	31.2	THI2878 <sup>c</sup>	<i>lpdA</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	62771/5.83	35	31	3
			14	>1000				62771/5.83	30	85	5
	DNA metabolism, transcription and protein synthesis	General stress	15	11.5	THI1477 <sup>c</sup>	<i>rkpK</i>	UDP-glucose 4-dehydrogenase	47843/6.19	64	35	14
		Arsenic resistance	16	>1000	THI3146 <sup>c</sup>	<i>arsA2</i>	Arsenical pump-driving ATPase	63845/5.89	101	23	28
		High temperature resistance	17	>1000	THI1202	<i>hifB</i>	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	37065/6.70	50	49	18
		DNA bending, supercoiling, inversion	18	12.6	THI1202	<i>groL</i>	GroEL, 60 kDa Chaperonin	57523/5.21	58	31	6
		RNA degradation	19	4.6	THI2307 <sup>c</sup>	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	96531/5.54	68	42	3
			20	4.6	THI2844 <sup>c</sup> /THI3726	<i>pnp</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	77017/5.53	86	35	6
			21	2.9		<i>tufA</i>	Elongation factor G (EF-G)	77889/5.48	41	33	3
	Fatty acid and phospholipid metabolism		22	4.9				77889/5.48	86	45	20
			23	4.4		<i>fusA</i>	Elongation factor G (EF-G)	77889/5.48	198	77	16
			24	>1000				77889/5.48	132	45	29
			25	2.3				77889/5.48	147	17	43
			26	3.8				77889/5.48	53	16	4
			27	4.2		<i>lysU</i>	Lysyl-tRNA synthetase, heat inducible	56670/5.54	87	18	13
		Translation attenuation and efficiency ; Adaptation to stress	28	8.5		<i>lysU</i>	Lysyl-tRNA synthetase, heat inducible	56670/5.54	66	22	7
	Others	Protein synthesis	29	6.3		<i>lysU</i>	30S ribosomal protein S2	27864/6.19	56	51	18
			30	>1000				27864/6.19	102	23	26
			31	>1000				27864/6.19	53	16	4
			32	3.1	THI0429 <sup>c</sup>	<i>lysU</i>	Lysyl-tRNA synthetase, heat inducible	56670/5.54	87	18	13
			33	3.6	THI2472	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	27864/6.19	66	45	20
			34	5.3	THI1116 <sup>c</sup>	<i>tppA</i>	GTP-binding protein: Tyrosine phosphorylated protein A	66591/5.31	56	36	2
			35	5.1	THI3470	/	Putative Site-specific recombinase XerD	70327/10.08	49	65	11
<i>Thiomonas</i> sp. 3As	Energy and carbon metabolism	DNA recombination	36	5.3	THI1931	/	Putative ATP-dependent Helicase	61787/5.92	58	49	12
		DNA restriction/modification	37	>1000	THI3331	/	Putative Restriction endonuclease	33723/5.58	54	44	14
		Fatty acid metabolism	38	5.6	THI3275 <sup>c</sup>	/	Putative long-chain-fatty-acid-CoA ligase	62346/5.61	35	90	3
		Long-chain fatty acid synthesis	39	4.3	THI2760	<i>accB</i>	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase (BCCP)	17397/4.62	64	8	3
			40	3.4	THI208 <sup>c</sup>	<i>puuC</i>	Gamma-glutamyl-gamma-aminobutyryl-dehydrogenase	54250/5.85	65	61	2
			41	>1000		<i>puuC</i>	Putative oxidoreductase	50805/6.94	76	73	6
			42	>1000				50805/6.94	198	77	16
<i>Tm. arsenivorans</i>	Central intermediary metabolism	Calvin Cycle	1	0.1	THI0135	<i>rbcL</i>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	53210/5.82	173	45	36
		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	0.5	THI0164	<i>cbbA1</i>	Fructose bisphosphate aldolase	38376/5.62	208	45	48
			3	5.1	THI1747	<i>aceA</i>	Isocitrate lyase	47725/5.77	187	37	51
		Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4	2.1	THI1422	/	Tartrate dehydrogenase/decarboxylase (TDH) (D-malate dehydrogenase [decarboxylating])	40204/5.74	68	147	28
			5	<0.001	THI2680	<i>aceE</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	101570/6.02	214	42	25
		Pentose and glucuronate interconversions	6	<0.001	THI2130	<i>eno2</i>	Enolase	45896/5.33	60	51	23
		Thiosulfate oxidation	7	<0.001	THI2667	/	Putative sulfur oxidation protein SoxB	64134/7.69	134	29	28
<i>Thiomonas</i> sp. 3As	DNA metabolism, transcription and protein synthesis	S-adenosylmethionine synthesis	8	2.0	THI2573	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase (Methionine adenosyltransferase) (AdoMet synthetase) (MAT)	43164/5.59	205	24	51
		Leucine biosynthesis	9	<0.001	THI1741	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	63110/5.72	159	52	33
		Phenylalanine biosynthesis	10	4.0	THI2305	<i>pheA</i>	P-protein	40207/5.9	221	27	65
		Glycine, serine and threonine metabolism	11	6.6	THI3280	/	putative Serine-pyruvate aminotransferase	41916/6.32	182	45	52
		Thiamine synthesis	12	20.9	THI1582	<i>thiC</i>	Thiamine biosynthesis protein ThiC	73957/5.68	75	37	14
		Biotin synthesis	13	4.1	THI0201	/	Adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate transaminase	50874/6.08	139	57	33
		Arsenic resistance	14	25.3	THI2254	<i>arsC1</i>	Arsenate reductase	20308/5.41	128	161	86
<i>Tm. arsenivorans</i>	Others	Other stresses (mechanical, nutritional, oxidative)	15	<0.01	THI2726	<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	56623/5.55	128	34	30
			16	<0.001	THI1559	/	putative Methyl-accepting chemotaxis protein	35610/4.92	144	52	45
			17	<0.001	THI0850	/	Putative Type IV pilus assembly protein PilM	39222/5.17	134	40	42
		Cell division	18	<0.001	THI2695	/	Putative Cell division protein	77516/5.54	84	82	17
		DNA replication/repair	19	2.6	THI1898	<i>ligA</i>	DNA ligase	74677/5.78	86	47	15
			20	2.4	THI1572	<i>polA</i>	DNA polymerase I	101323/5.43	245	42	37
		DNA bending, supercoiling, inversion	21	<0.001	THI2307	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	95760/5.43	216	43	35
<i>Thiomonas</i> sp. 3As	DNA metabolism, transcription and protein synthesis	RNA degradation	22	<0.001	THI2644	<i>pnp</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	77131/5.42	265	44	45
		Protein synthesis	23	<0.001	THI2301	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	61876/5.15	101	130	28
			24	0.4	THI2152	<i>greA</i>	Transcription elongation factor GreA	16944/4.84	100	43	49
		Purine/pyrimidine biosynthesis	25	2.4	THI2186	/	Putative Xanthine phosphoribosyltransferase	19756/5.6	97	28	41
			26	<0.001	THI2153	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase	118161/5.12	445	44	53
		Regulation	27	0.3	THI1579	<i>wrbA</i>	Flavoprotein WrbA (Trp repressor-binding protein)	21385/6.43	135	29	62
		Others	28	0.2	THI1731	/	Unknown function	45629/5.77	146	41	39

<sup>a</sup>Mean value of the spot volumes calculated in the presence of As divided by the mean value of the same spot volumes calculated in the absence of arsenic; <sup>b</sup>CDS (Coding Sequence) name according to the *Thiomonas* sp. 3As genome sequence (Arsene-Pioletz and Bertin, unpublished data); <sup>c</sup>Protein or peptide identified by MS/MS; \*Protein identified by both MALDI and MS/MS; <sup>d</sup>Protein identified by MALDI.

## **C. Comparaison génomique de souches du genre *Thiomonas***

---

### **Article 2 :**

#### **Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome**

F. Arsène-Ploetze, S. Koechler, M. Marchal, J.-Y. Coppée, M. Chandler, V. Bonnefoy, C. Brochier-Armanet, M. Barakat, V. Barbe, F. Battaglia-Brunet, O. Bruneel, C. G. Bryan, J. Cleiss-Arnold, S. Cruveiller, M. Erhardt, A. Heinrich-Salmeron, F. Hommais, C. Joulian, E. Krin, A. Lieutaud, D. Lièvremont, C. Michel, D. Muller, P. Ortet, C. Proux, P. Siguier, D. Roche, Z. Rouy, G. Salvignol, D. Slyemi, E. Talla, S. Weiss, J. Weissenbach, C. Médigue, P. N. Bertin

*PLoS Genetics*, 2010, 6(2): e1000859

# Structure, Function, and Evolution of the *Thiomonas* spp. Genome

Florence Arsène-Pioletze<sup>1</sup>, Sandrine Koechler<sup>1</sup>, Marie Marchal<sup>1</sup>, Jean-Yves Coppée<sup>2</sup>, Michael Chandler<sup>3</sup>, Violaine Bonnefoy<sup>4</sup>, Céline Brochier-Armanet<sup>4</sup>, Mohamed Barakat<sup>5</sup>, Valérie Barbe<sup>6</sup>, Fabienne Battaglia-Brunet<sup>7</sup>, Odile Bruneel<sup>8</sup>, Christopher G. Bryan<sup>1</sup><sup>✉a</sup>, Jessica Cleiss-Arnold<sup>1</sup>, Stéphane Cruveiller<sup>6,9</sup>, Mathieu Erhardt<sup>10</sup>, Audrey Heinrich-Salmeron<sup>1</sup>, Florence Hommais<sup>11</sup>, Catherine Joulian<sup>7</sup>, Evelyne Krin<sup>12</sup>, Aurélie Lieutaud<sup>4</sup>, Didier Lièvremont<sup>1</sup>, Caroline Michel<sup>7</sup>, Daniel Muller<sup>1</sup><sup>✉b</sup>, Philippe Ortet<sup>5</sup>, Caroline Proux<sup>2</sup>, Patricia Siguier<sup>3</sup>, David Roche<sup>6,9</sup>, Zoé Rouy<sup>6</sup>, Grégory Salvignol<sup>9</sup>, Djamila Slyemi<sup>4</sup>, Emmanuel Talla<sup>4</sup>, Stéphanie Weiss<sup>1</sup>, Jean Weissenbach<sup>6,9</sup>, Claudine Médigue<sup>6,9</sup>, Philippe N. Bertin<sup>1\*</sup>

**1** Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR7156 CNRS and Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **2** Genopole, Plate-forme puces à ADN, Institut Pasteur, Paris, France, **3** Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, UMR5100, Toulouse, France, **4** Laboratoire de Chimie Bactérienne, UPR9043 CNRS, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille, France, **5** Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie, CEA-CNRS-Université Aix-Marseille II, Saint-Paul-lez-Durance, France, **6** Institut de Génomique, CEA-DSV, Génoscope, Evry, France, **7** Environnement et Procédés, Ecotechnologie, BRGM, Orléans, France, **8** Laboratoire Hydrosciences Montpellier, UMR 5569 CNRS, IRD and Universités Montpellier I and II, Montpellier, France, **9** Génomique Métabolique, Laboratoire de Génomique Comparative, CNRS UMR8030, Evry, France, **10** Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **11** Unité Microbiologie, Adaptation, Pathogénie, CNRS-INSA-UCB UMR 5240, Université Lyon 1, Villeurbanne, France, **12** Génétique des Génomes Bactériens, URA2171, Institut Pasteur, Paris, France

## Abstract

Bacteria of the *Thiomonas* genus are ubiquitous in extreme environments, such as arsenic-rich acid mine drainage (AMD). The genome of one of these strains, *Thiomonas* sp. 3As, was sequenced, annotated, and examined, revealing specific adaptations allowing this bacterium to survive and grow in its highly toxic environment. In order to explore genomic diversity as well as genetic evolution in *Thiomonas* spp., a comparative genomic hybridization (CGH) approach was used on eight different strains of the *Thiomonas* genus, including five strains of the same species. Our results suggest that the *Thiomonas* genome has evolved through the gain or loss of genomic islands and that this evolution is influenced by the specific environmental conditions in which the strains live.

**Citation:** Arsène-Pioletze F, Koechler S, Marchal M, Coppée J-Y, Chandler M, et al. (2010) Structure, Function, and Evolution of the *Thiomonas* spp. Genome. PLoS Genet 6(2): e1000859. doi:10.1371/journal.pgen.1000859

**Editor:** Nancy A. Moran, University of Arizona, United States of America

**Received** July 28, 2009; **Accepted** January 25, 2010; **Published** February 26, 2010

**Copyright:** © 2010 Arsène-Pioletze et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by the ANR 07-BLAN-0118 project (Agence Nationale de la Recherche). Annotation and database management were supported by a grant from ANR 07-PTV MicroScope project. CGB was supported by a grant from the University of Strasbourg; MM by a grant from ANR COBIAS project (PRECODD 2007, Agence Nationale de la Recherche); JC, AHS, SW, and DS by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie; and AL by a grant from ADEME-BRGM. This work was performed within the framework of the French research network “Arsenic metabolism in microorganisms” (GDR2909-CNRS)(<http://gdr2909.u-strasbg.fr>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: philippe.bertin@unistra.fr

<sup>✉a</sup> Current address: Centre for Bioprocess Engineering Research (CeBER), Dept. Chemical Engineering, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa

<sup>✉b</sup> Current address: Université Lyon 1, CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France

## Introduction

In environments such as those impacted by acid mine drainage (AMD), high toxic element concentrations, low levels of organic matter and low pH make growth conditions extreme. AMD is generally characterized by elevated sulfate, iron and other metal concentrations, in particular, inorganic forms of arsenic such as arsenite (As(III)) and arsenate (As(V)) [1,2]. While these waters are toxic to the majority of prokaryotic and eukaryotic organisms, a few Bacteria and Archaea are not only resistant to but also able to metabolize some of the toxic compounds present [1]. Members of the *Thiomonas* genus are frequently found in AMD and AMD-impacted environments, as *Thiomonas* sp. 3As and “*Thiomonas arsenivorans*” [2–6]. These *Beta*proteobacteria have been defined as

facultative chemolithoautotrophs, which grow optimally in mixotrophic media containing reduced inorganic sulfur compounds (RISCs) and organic supplements. Some strains are capable of autotrophic growth and others are capable of organotrophic growth in the absence of any inorganic energy source [5,7,8]. Recently described species and isolates include “*Tm. arsenivorans*” [9], *Tm. delicata* [10], *Thiomonas* sp. 3As [5] and Ynys1 [11]. *Thiomonas* sp. 3As as well as other recently isolated strains from AMD draining the Carnoulès mine site (southeastern France) containing a high arsenic concentration (up to 350 mg L<sup>-1</sup>) [3,12], present interesting physiological and metabolic capacities, in particular an ability to oxidize As(III).

Over the past few years an increasing number of genomes has been sequenced, revealing that bacterial species harbor a core



## Author Summary

Recent advances in the field of arsenic microbial metabolism have revealed that bacteria colonize a large panel of highly contaminated environments. Belonging to the order of Burkholderiales, *Thiomonas* strains are ubiquitous in arsenic-contaminated environments. The genome of one of them, i.e. *Thiomonas* sp. 3As, was deciphered and compared to the genome of several other *Thiomonas* strains. We found that their flexible gene pool evolved to allow both the surviving and growth in their peculiar environment. In particular, the acquisition by strains of the same species of different genomic islands conferred heavy metal resistance and metabolic idiosyncrasies. Our comparative genomic analyses suggest that the natural environment influences the genomic evolution of these bacteria. Importantly, these results highlight the genomic variability that may exist inside a taxonomic group, enlarging the concept of bacterial species.

genome containing essential genes and a dispensable genome carrying accessory genes [13]. Some of these accessory genes are found within genomic islands (GEIs) [14] and have been acquired by horizontal gene transfer (HGT). These GEIs are discrete DNA segments (from 10 to 200 kbp) characterized by nucleotide statistics (G+C content or codon usage) that differ from the rest of the genome, and are often inserted in tRNA or tRNA-like genes. Their boundaries are frequently determined by 16–20 bp (up to 130 bp) perfect or almost perfect direct repeats (DRs). These regions often harbor functional or cryptic genes encoding integrases or factors involved in plasmid conjugation or related to phages. GEIs encompass other categories of elements such as integrative and conjugative elements (ICE), conjugative transposons and cryptic or defective prophages. Such GEIs are self-mobile and play an important role in genome plasticity [14]. In almost all cases, GEIs have been detected *in silico*, by the comparison of closely related strains. Nevertheless, the role of GEIs in genome plasticity has also been experimentally demonstrated in several pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* or *Yersinia pseudotuberculosis* [15,16] or in *Pseudomonas* sp. strain B13 isolated from a sewage treatment plant [17].

Deciphering dispensable genomes has revealed that the loss or gain of genomic islands may be important for bacterial evolution [18]. Indeed, these analyses allow the determination of the genome sequence, called pan-genome or supragenome, not just of individual bacteria, but also of entire species, genera or even bacterial kingdom [19,20]. These data result in debates on taxonomic methods used to define the bacterial species [21,22], e.g. pathogens such as *Streptococcus agalactiae* [21,23] or environmental bacteria such as *Prochlorococcus* [24,25] or *Agrobacterium* [26]. However, beyond these well-known and cultivable microorganisms, the diversity of bacteria, in particular those found in extreme environments, has hitherto been comparatively poorly studied. Genome analysis of such extremophiles may yet reveal interesting capacities since these bacteria may express unexpected and unusual enzymes [27]. Since the role of GEIs in extremophiles has not been yet well explored, little is known about their evolution.

In the present study, the genome of *Thiomonas* sp. 3As was sequenced and analyzed. It was next compared to the genome of other *Thiomonas* strains, either of the same species or of other species of the same genus. This genome exploration revealed that *Thiomonas* sp. 3As evolved to survive and grow in its particular extreme environment, probably through the acquisition of GEIs.

## Results

### General Features of the *Thiomonas* sp. 3As Genome

The genome of *Thiomonas* sp. 3As comprises a 3.7 Mbp circular chromosome and a 46.8 kbp plasmid (Table 1). The single circular chromosome contains 3,632 coding sequences (CDSs) (Table 1, Figure S1A). The mean G+C content of the *Thiomonas* sp. 3As genome is 63.8%. However, the distribution along the genome revealed several regions with a G+C content clearly divergent from this mean value (Figure S1). This suggests that several genomic regions are of exogenous origin. Indeed, 196 genes having mobile and extrachromosomal element functions were identified in the genome, among which a total of 91 ISs (Figure S1A, Table S1) representing 2.5% of total CDS. None of these ISs were found as part of composite transposons, while several were identified as neighbors of phage-like site-specific recombinases.

The plasmid, pTHI, contains 68 predicted CDS. 21 genes were found in synteny with genes carried by the *R. eutropha* JMP134 plasmid pJP4, and among them, *par/tff/pem* genes necessary for plasmid partitioning, stability and replication (Figure S1B). These observations suggest that pTHI, as JMP134, belongs to the IncP-1β group [28]. pTHI contains 13 of the 14 genes involved in conjugation (*vir* and *tra* genes) and genes that could fulfill the function of the missing components were found on the chromosome. Therefore, *Thiomonas* sp. 3As may be able to express a complete Type IV secretory system (T4SS) of the Vir/Tra type required for pTHI conjugal transfer. IncP-1β members are known to carry multi-resistance determinants and degradative cassettes [28], and plasmid pTHI indeed carries a Tn3-related transposon. This transposon contains part of a mercury resistance operon found in many other Gram negative bacterial transposon such as Tn21, Tn501 and Tn5053 [29].

### Carbon and Energy Metabolism

*Thiomonas* sp. 3As is able to use organic compounds as a carbon source or electron donor [5,8]. However, under certain conditions this bacterium may also be able to grow autotrophically [5]. A complete set of *cbb/rbc/cso* genes involved in carbon fixation via the Calvin cycle, and genes involved in glycogen, starch and polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthesis pathways were identified (Figure 1 and [5]). Fructose, glucose, several amino acid, C4-dicarboxylates, propionate, acetate, lactate, formate, ethanol and glycerol are potential carbon sources or electron donors, since genes involved in their import or degradation via the glycolysis, the Entner-Doudoroff, the TriCarboxylic Acid (TCA) or the “rubisco shunt” pathways are present in the genome. The presence of all genes involved in the oxidative phosphorylation pathway (Figure 1) suggests that *Thiomonas* sp. 3As has a respiratory metabolism. Moreover, since several genes coding for terminal oxidases (i.e. *cbb<sub>3</sub>*, *bd* or *aa<sub>3</sub>*) were found, this respiratory metabolism may occur over a wide range of oxygen tensions. Finally, the presence of a nitrate reductase and of several formate dehydrogenases suggests that *Thiomonas* sp. 3As is able to use nitrate anaerobically as an electron acceptor and formate as electron donor. In the absence of carbohydrates, *Thiomonas* sp. 3As is a chemolithotroph and may use reduced inorganic sulfur compounds (RISCs) as an electron donor [5]. The presence of *soxRCDYZAXB*, *dsr*, *sorAB*, *sqr* and *fccAB* genes revealed that *Thiomonas* can oxidize thiosulfate, sulfite, S<sup>0</sup> or H<sub>2</sub>S to sulfate (Figure 1) [30,31].

### Adaptive Capacities of *Thiomonas* sp. 3As to Its Extreme Environment

*Thiomonas* sp. is a moderate acidophile. Its optimum pH is 5 but this bacterium can withstand to pH as low as 2.9 (Slyemi, Johnson



**Table 1.** General genome and plasmid features.

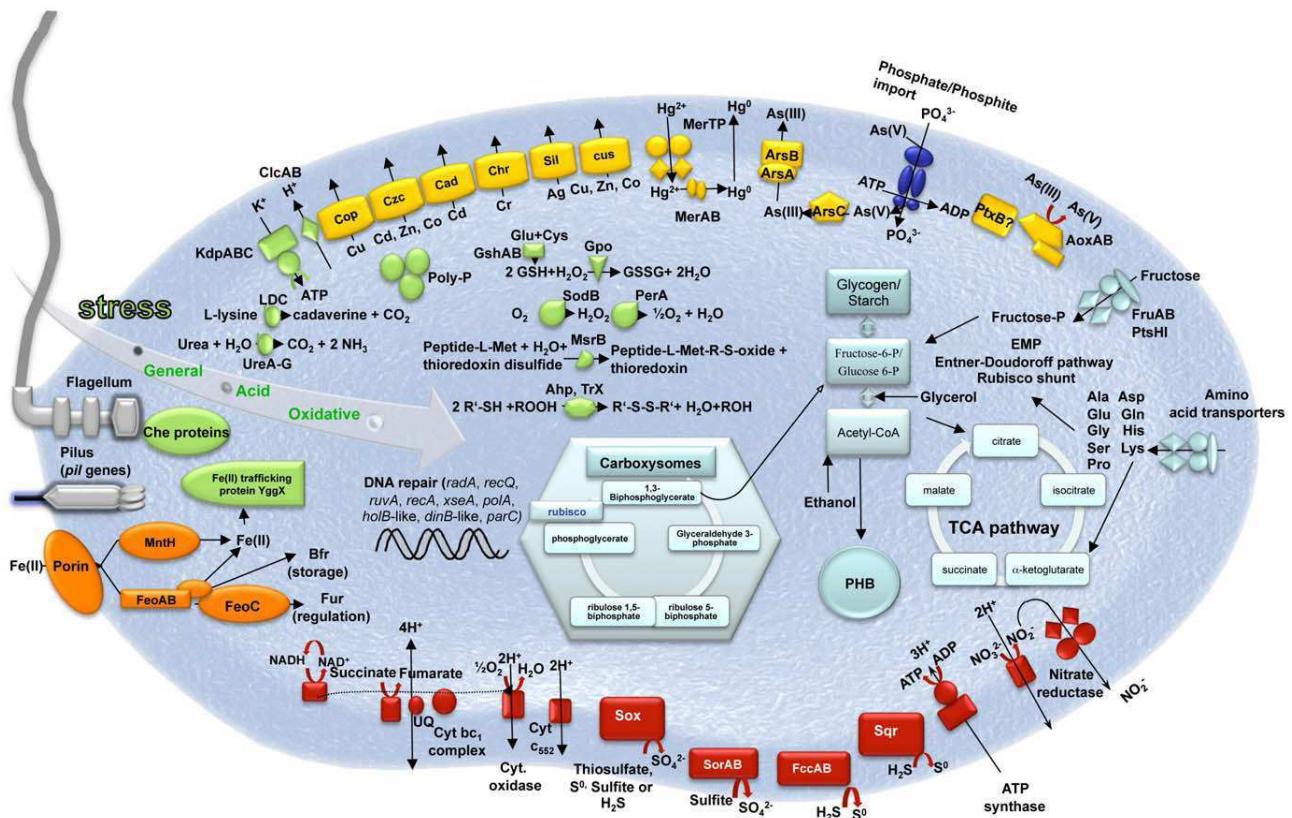
Molecule	Category	Feature	Value
Plasmid	General characteristics	Size (bp)	46,756
		GC content (%)	60.49
		Coding density (%)	88.19
		Predicted CDSs	68
	Proteins with predicted function	Percent of total CDSs	48.52
		Secretion (%)	11.76
		Partitioning	2.94
		Replication, recombination	8.82
		Inorganic ion transport and metabolism (Hg)	2.94
		Conserved hypothetical proteins (%)	13.24
Genome	General characteristics	No homology to any previously reported sequences (%)	38.24
		Percent of total CDSs	51.48
		Size (bp)	3,738,778
		GC content (%)	63.8
		Coding density (%)	90.01
	16S-23S-5S rRNA operons	16S-23S-5S rRNA operons	1
		tRNAs	43
		Predicted CDSs	3,632
		Percent of total CDSs	74.2
	Proteins with predicted function	Heavy metal resistance (%)	1.6
		Related to arsenic metabolism/transport (%)	0.6
		Conserved hypothetical proteins (%)	13.54
	Proteins without predicted function	Hypothetical proteins (%)	11.95
		Percent of total CDSs	25.8
		Mobile and extrachromosomal element functions	Percent of total CDSs
	Mobile and extrachromosomal element functions	Percent of total CDSs	5.4
		Transposases (nb CDSs)	101
		Phage related (nb CDSs)	61
	Repeated regions (%)		7.62

doi:10.1371/journal.pgen.1000859.t001

and Bonnefoy, personal communication). *Thiomonas* sp. 3As pH homeostasis mechanisms may therefore be strictly controlled as previously described [32,33]. First, genes encoding a potassium-transporting P type ATPase (*kdpABC*) are present in the *Thiomonas* sp. 3As genome. This ATPase could be involved in the generation of a positive internal potential produced by a greater influx of potassium ions than the outward flux of protons. Second, to strengthen the membrane, likely by lowering membrane proton conductance, *Thiomonas* sp. has cyclopropane fatty acids [5]. Accordingly, two putative *cfa* genes encoding cyclopropane fatty acid synthase have been detected. Third, cytoplasmic buffering can be mediated either by amino acid decarboxylation and/or by polyphosphate granules. Genes encoding decarboxylases for lysine (4 CDS), phosphatidyl serine and glycine are present on *Thiomonas* sp. 3As genome. Moreover, urea (formed from arginine by arginase) may be degraded by urease (*ure* genes) or urea carboxylase and allophanate hydrolase. Urease encoding genes are known to be involved in acid tolerance in *Helicobacter pylori* [34]. Protons may be captured during polyphosphate synthesis. Polyphosphate granules have indeed been observed in electron micrographs of thin sections of *Thiomonas* sp. 3As [5]. Genes involved in such mechanisms (*ppk*, *pap*, *ppx*) were found in 3As genome. Fourth, primary and secondary proton efflux transporters

were predicted by genome sequence analysis, including four putative  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers and voltage gated channels for chloride involved in the extreme acid resistance response in *E. coli* (*clcAB*) [35]. Finally, the elimination of organic acids can lead to pH homeostasis. Some organic acid degradation pathways have been detected in *Thiomonas* sp. such as an acetyl-CoA synthetase-like. Moreover, formate oxidation was observed (Slyemi, Johnson and Bonnefoy, personal communication) and two formate dehydrogenases are encoded by the *Thiomonas* sp. 3As genome, these enzymes could convert acetate to acetyl-CoA and formate to  $\text{CO}_2$  and hydrogen, respectively.

The Carnoules AMD contains a high concentration of heavy metals such as zinc or lead. To resist to heavy metals, bacteria usually develop several resistance mechanism including toxic compounds extrusion pumps [36] or biofilm synthesis [37]. Flagella are important for the first steps of biofilm formation and all genes involved in motility, twitching and chemotaxis, were found in its genome. *Thiomonas* sp. 3As is motile but, unlike *H. arsenicoxydans*, this motility was not affected by arsenic concentration (Table S2, [38]). Finally, *Thiomonas* sp. 3As is able to synthesize exopolysaccharides (Table S2), and one *eps* operon involved in their synthesis was identified in the genome, as well as two *mdoDG* clusters involved in glucan synthesis. Several genes



**Figure 1. Schematic representation of the major metabolic pathways in *Thiomonas* sp. 3As.** These metabolic pathways were ascertained using genome and physiological data ([5], this study). Light blue, carbon metabolism; Red, oxidative phosphorylation; Green, stress response; Yellow, heavy metal resistance; Orange, iron metabolism; Dark blue, phosphate import (*pst* genes).

conferring resistance to cadmium, zinc, silver, (*cad*, *czc*, and *sil* genes), chromium (*chr* genes), mercury (2 *mer* operons encoding both MerA reductase but no organomercury lyase MerB), copper (*cop* and *cus* genes) and tellurite (transporters THI\_0898-0899) are likely involved in *Thiomonas* sp. 3As heavy metal resistance (Figure 1). Arsenic resistance in bacteria is partly due to the expression of *ars* genes, among which, *arsC* encodes an arsenite reductase, *arsA* and *arsB* encode an arsenite efflux pump, *arsR* encodes a transcriptional regulator [39]. *Thiomonas* sp. 3As is resistant to up to 50 mM As(V) and up to 6 mM As(III) (Table S2, [8]). The analysis of the *Thiomonas* sp. 3As genome revealed the presence of two copies of the *ars* operon, an *arsRBC* operon (*ars1*) and an *arsRDABC* operon (*ars2*). *Thiomonas* sp. 3As is able to oxidize As(III) to As(V) [5] and this metabolism involves the arsenite oxidase encoded by *aoxAB* genes [5] (Figure 1). It has been shown that arsenite is imported via the aquaglyceroporin GlpF in *E. coli* [40]. However, as in *H. arsenicoxydans* [38], no homologue of GlpF was identified in the *Thiomonas* sp. 3As genome, suggesting that As(III) is imported via an unknown component.

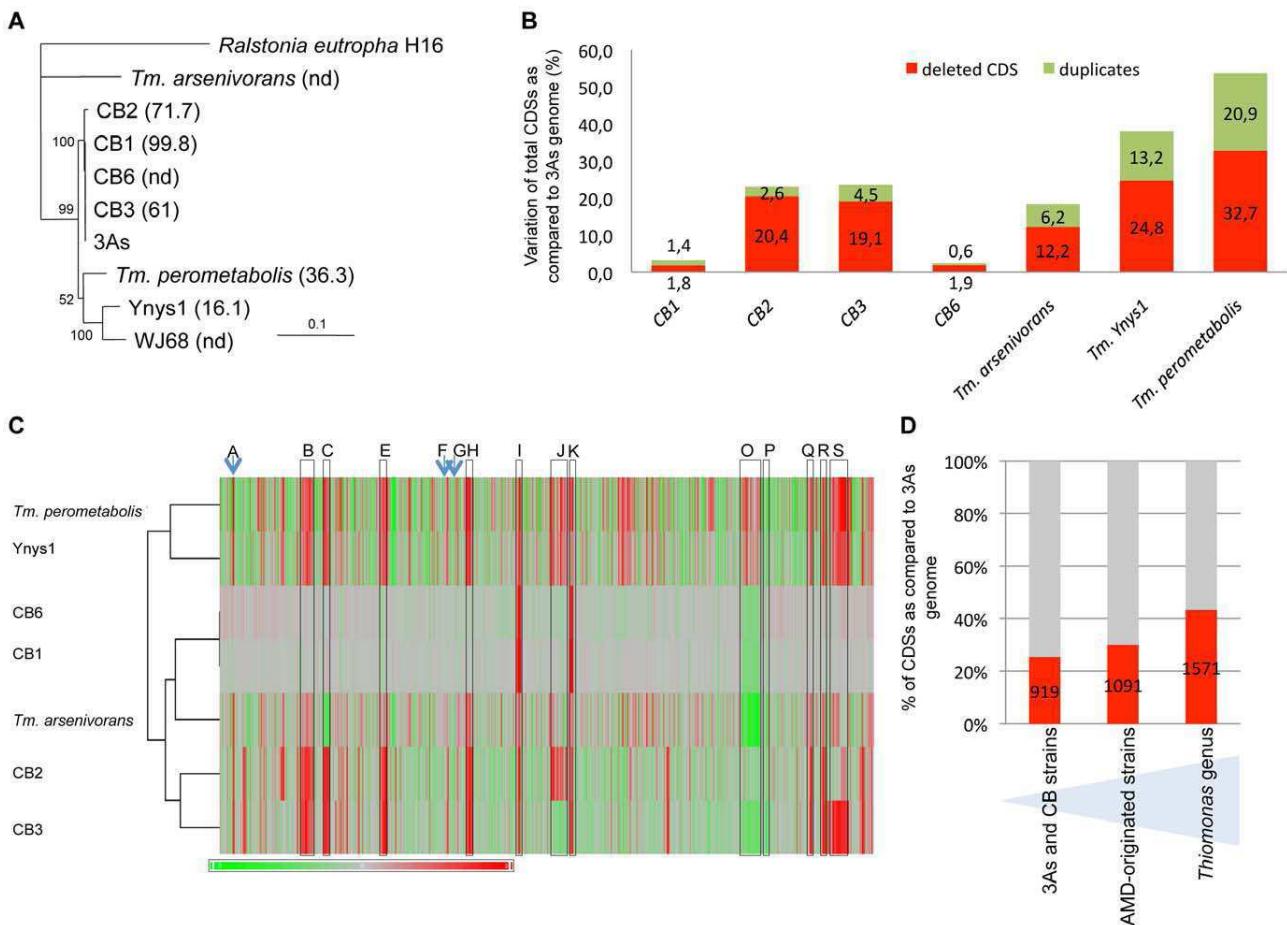
As(III) is known to induce DNA damage and oxidative stress [41,42]. 24 genes involved in such stress responses were identified in the *Thiomonas* sp. 3As genome (Figure 1). Moreover, this genome carries 54 genes involved in DNA repair. However, this strain lacks some genes present in *H. arsenicoxydans*, such as *alkB*, whereas two genes involved in mismatch repair were duplicated. Orthologs of genes that have been shown to be induced in response to arsenic in *H. arsenicoxydans* [38] were found in *Thiomonas* sp. 3As, i.e. *radA*, *recQ*, *ruvA*, *recA*, *xseA*, *polA*, *holB*-like, *dinB*-like and *parC*. The

expression of *polA* has been previously shown to be induced in the presence of arsenic [8], suggesting that the *Thiomonas* sp. 3As response to arsenic include the expression of genes involved in DNA repair.

#### Comparative Genomic Analyses Allowed the Definition of 19 Genomic Islands (GEIs)

Several *Thiomonas* strains called CB1, CB2, CB3 and CB6 were isolated from the same environmental site as *Thiomonas* sp. 3As. The 16S rRNA/*rpoD*-based phylogeny of these isolates (>97% nucleotide identity), as well as DNA-DNA hybridization experiments (Figure 2A), revealed that they represent different strains of the same species. All these strains are able to oxidize As(III) and are resistant to As(III) (Table S2). Nevertheless, subtle physiological differences were observed (Table S2).

The existence of both phylogenetical relationships and physiological differences between these strains prompted us to perform a comparative genome analysis in order to address the evolution of *Thiomonas* strains. Therefore, genome variability was searched for by investigating genetic similarities and diversities among these closely related *Thiomonas* strains, using a Comparative Genomic Hybridization (CGH) approach (Figure 3). These experiments revealed the presence of a flexible CDS (duplicated, absent or highly divergent) pool in CB1, CB6 CB3 and CB2 (Figure 2B, Figure 3, ArrayExpress database, accession number E-MEXP-2260) representing 2.5%, 3.2%, 24.1% and 23.1% of the genome of strain 3As (Figure 2B), respectively. Altogether, these experiments led to the definition of 919 dispensable CDS, i.e. absent or



**Figure 2. Genomic diversity among *Thiomonas* strains.** (A) Phylogenetic dendrogram of the SuperGene construct of both the 16S rRNA and *rpoA* genes of the *Thiomonas* strains used in this study. *Ralstonia eutropha* H16 served as the outgroup. The DNA-DNA hybridization percentage is included in brackets. nd: not determined (CB1 and CB6 were almost identical at the genetic content level. For this reason, DNA-DNA hybridization analyses were performed only with CB1). Numbers at the branches indicate percentage bootstrap support from 500 re-samplings for ML analysis. NJ analyses produced the same branch positions (not shown). The scale bar represents changes per nucleotide; (B) number of variable CDS exhibited by each strain determined by CGH, expressed as a percent of the total number of 3As CDS; (C) hierarchical clustering established based on CGH experiments, represented as a composite view of genome diversity in *Thiomonas* strains compared to 3As. The column represents genes as they are found along 3As genome, starting from the origin of replication (THI0001). Results for each strain are shown in each row. Red color indicates absence or strong divergence leading to reduced hybridization efficiency as compared to the corresponding *Thiomonas* sp. 3As gene ( $\log_2(A_{635 \text{ nm}}/A_{532 \text{ nm}}) \leq -1$ ); Green color indicates a  $\log_2(A_{635 \text{ nm}}/A_{532 \text{ nm}}) \geq 1$ , suggesting duplication of this gene. The regions corresponding to ThGEI-A, B, C, E, F, G, H, I, J, K, O, P, Q, R and S are indicated by a blue arrow or a grey rectangle; (D) percent of CDS found in core (in grey) or in dispensable (in red) genome, in 3As and CB strains (1<sup>st</sup> column), in AMD-originated strains (3As, CB strains and “*Tm. arsenivorans*”, 2<sup>nd</sup> column), or in all *Thiomonas* strains (3<sup>rd</sup> column).

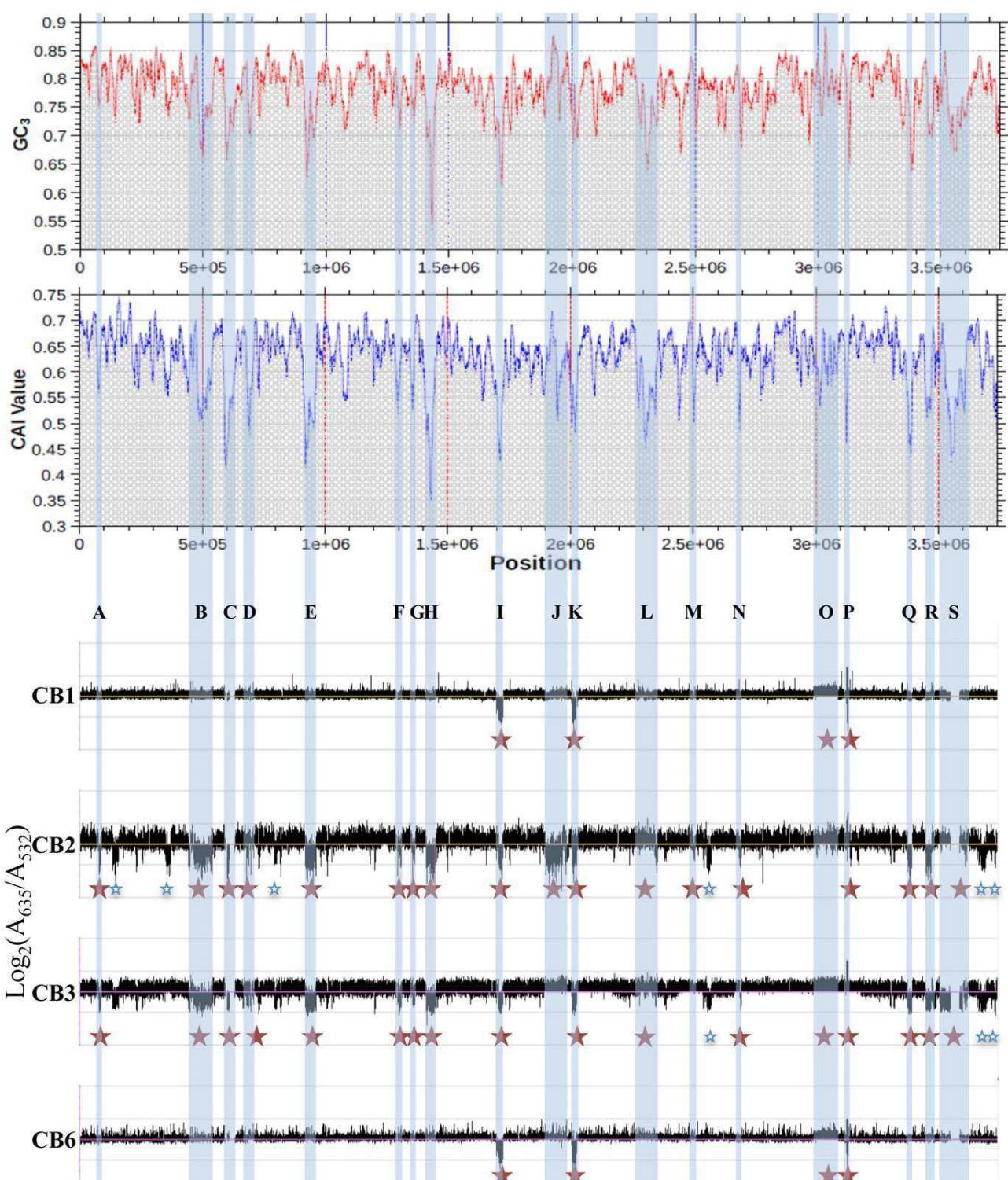
doi:10.1371/journal.pgen.1000859.g002

highly divergent in at least one strain, accounting for 25.3% of strain 3As genes (Figure 2D). The remaining conserved CDS (2713 CDS, 74.7% of the genome of strain 3As) represent a common backbone of the “core” genes of this species.

In order to enlarge our comparative analysis, genomic similarities were similarly searched for in other *Thiomonas* species: an arsenite-oxidizing strain, “*Tm. arsenivorans*”, and two closely related strains that are unable to oxidize arsenite, *Tm. perometabolis* and *Thiomonas* sp. Ynys1 (Table S2, Figure 2, ArrayExpress database, accession number E-MEXP-2260). No significant hybridization was observed with oligomers corresponding to the plasmid, suggesting that pTHI is absent in all these strains. 18.4, 37.9 and 53.6% of the 3As CDS were flexible in “*Tm. arsenivorans*”, Ynys1 and *Tm. perometabolis*, respectively. Altogether, 1571 CDS accounting for at least 43.3% of the *Thiomonas* sp. 3As genome were found in the *Thiomonas* genus dispensable genome (Figure 3D).

Finally, these CGH experiments revealed that the *Thiomonas* core genome contains 2,061 CDS (56.7% of the *Thiomonas* genome). Interestingly, almost all genes involved in acid resistance described above, were found in this core genome, as for example genes involved in polyphosphate granule synthesis, *cfa* and *kdp* genes, genes encoding ion transporter amino acid decarboxylase, formate dehydrogenase and other hydrogenases. One *ars* operon involved in arsenic resistance, i.e. *ars1*, and almost all genes involved in DNA repair were also conserved in all strains.

Among the flexible pool, 19 regions (ThGEI-A - ThGEI-S) had similarities with GEIs found in other bacterial genomes, suggesting that they were possibly acquired by horizontal gene transfer: (i) an abnormal deviation of the codon adaptation index (CAI) and the GC content at the 3<sup>rd</sup> nucleotide position of each codon (GC<sub>3</sub>) was observed in these regions as compared to the rest of the genome (Figure 3), (ii) many of their genes formed syntenic blocks that



**Figure 3. Deleted or duplicated regions in CB strains, obtained by CGH experiments.** The codon adaptation index (CAI) and the GC content at the 3<sup>rd</sup> nucleotide position of each codon (GC<sub>3</sub>) of *Thiomonas* sp. 3As is shown in the upper part. Y-axis displays the log<sub>2</sub>-ratios (Cy5 (measured at 635 nm)/Cy3 (measured at 532 nm)). Red stars: variable regions found in CB strains and corresponding to GEIs; Blue stars: other variable regions.  
doi:10.1371/journal.pgen.1000859.g003

differed from the general synteny observed in the rest of the genome (Table S3), (iii) genes with mobile and extrachromosomal element functions such as those coding for integrases were

localized within these regions, (iv) these regions were present at the 3'-end of tRNA or miscRNA genes, and/or (v) the borders of five deletions were verified in CB strains, by PCR and direct

repeats (10 to 112 bp-long) bordering these GEIs were found (Table S3).

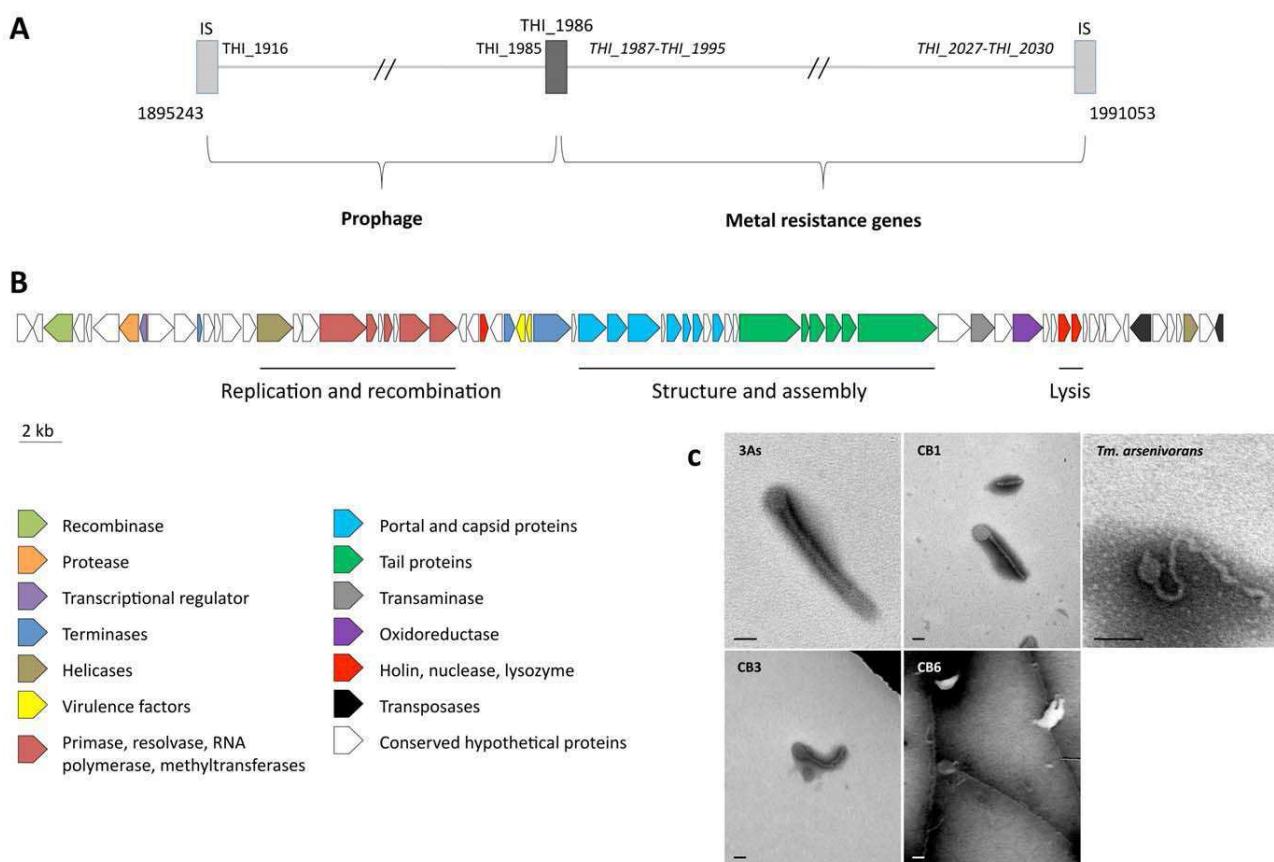
### Genetic Content of the 19 Genomic Islands Found in *Thiomonas* sp. 3As Genome

Genes found in the 19 *Thiomonas* sp. 3As GEIs and the syntenies they share with genes in other bacteria are shown in Table S3. Interestingly, 70 (76.9%) of the 91 complete and partial ISs identified in the genome were located in genomic islands which represent only 21.5% of the genome (Figure S1A). In addition to the high numbers of ISs found in these GEIs, many hypothetical proteins as well as modification/restriction enzymes were encoded by these regions. In ten GEIs, accessory genes are involved in a particular metabolism such as acetoin, atrazin, benzoate, ethyl tetra-butyl ether (ETBE) hydroxyisobutyrate phenylacetic acid and urea degradation (ThGEI-E, ThGEI-C, ThGEI-S or ThGEI-R), or heavy metal resistance (ThGEI-J, ThGEI-L, ThGEI-O).

Interestingly, several genes found in distinct GEIs shared high amino acid identity (>70%, Figure S2). In addition, 47 genes found in the two regions ThGEI-C and ThGEI-S shared 100% identity. Because of this duplication, a 7 kbp region in ThGEI-S could not be sequenced and this gap may correspond to duplicated

genes of ThGEI-C. These observations suggest that genomic rearrangements occurred between several GEIs. Moreover, several islands seem to be composite, since some fragments of such islands are deleted or duplicated in *Thiomonas* strains. Such composite structure may originate from insertion or excision of DNA elements in these GEIs, which involve integrase or excisionase. This hypothesis is strengthened by the observation that 32 integrases were found in almost all GEIs except for ThGEI-B and ThGEI-R. Some of such integrases are similar to phage integrases. In addition, 2 excisionases are present in ThGEI-H and ThGEI-P and such genes were localized in the vicinity of tRNA, an additional phage-like character.

One GEI, ThGEI-J, contains a prophage region (55.6 kbp) and a cluster of 6 heavy metal resistance genes (39.4 kbp, i.e., *cad*, *cus*, *czc* and *sil* genes involved in resistance to Cd, Cu, Zn, Co and Ag) (Figure 4). The prophage region comprises 27 phage-related genes coding for structural and capsid or tail assembly proteins, replication, lysis and virulence factors. No conserved synteny with any previously described prophage could be observed. However, filamentous phage-like particles with icosahedral symmetry (capsid diameter of approximately 100 nm) and a various length tail (>600 nm), were observed by TEM from *Thiomonas* sp. 3As liquid



**Figure 4. Prophage-like region and phage-like particle.** (A) Schematic representation of the prophage-like region (55.6 kbp) and the contiguous metal resistance gene cluster (39.4 kbp). The total region is flanked by two ISs (light grey rectangles), and a partial transposase gene (THI\_1986, dark grey rectangle) delimiting the two clusters. Genes in italics are duplicated in the *Thiomonas* sp. 3As genome; (B) organization of the prophage-like region. The 71 putative CDS, colored according to their category, are shown by arrows representing their direction. This cluster corresponds to the unique prophage-like region of the genome, containing notably structural, lysis and virulence associated phage genes; (C) transmission-electron micrographs of taill bacteriophage-like particles from *Thiomonas* species. No bacteriophage-like particle was observed in *Thiomonas* sp. CB2 culture supernatant. Cultures were amended with mitomycin C (0.5 µg/mL). Bars: 100 nm. The 3As phage-like particle is hypothetically coded by the prophage-like region described above.

doi:10.1371/journal.pgen.1000859.g004

cultures exposed to the phage lytic phase inducer mitomycin C. Similar phage-like particles were observed in growth culture supernatants from CB1, CB3, CB6 and “*Tm. arsenivorans*” (Figure 4) but not from CB2, Ynys1 and *Tm. perometabolis* (data not shown), in agreement with CGH results showing that the ThGEI-J is absent in these strains (Figure 3, Table S3, ArrayExpress database, accession number E-MEXP-2260). These observations suggest that this prophage-like region may be functional in 3As, CB1, CB3, CB6 and “*Tm. arsenivorans*” under stress conditions, resulting in the formation of phage-like particles.

### ThGEI-L and ThGEI-O Gene Content and Their Probable Acquisition by HGT

GEIs contribute to the adaptation of microorganisms to their ecological niches and participate in genome plasticity and evolution [14]. Therefore, the environmental conditions may influence the loss or conservation of GEIs. Such hypothesis was checked by searching for genome similarities between strains originated from similar environments, i.e. AMD. To this aim, a hierarchical clustering was established based on genomic comparisons (Figure 2C). Interestingly, the clustering obtained was different from that of the 16S rRNA/*rpoA*-based phylogenetic trees (Figure 2A). Indeed, all strains that originated from AMD heavily loaded with arsenic, i.e. “*Tm. arsenivorans*” and strains 3As, CB1, CB2, CB3 and CB6, grouped together, whereas Ynys1 and *Tm. perometabolis* formed a distinct group. Genes possibly dispensable for AMD survival were therefore searched for and we identified 2541 CDS conserved in all strains originated from AMD, and these CDS may constitute the “AMD” core genome of *Thiomonas*. Interestingly, several genes present in the ThGEI-L and ThGEI-O were conserved in AMD-originated strains but absent in the other strains (Figure 5).

The ThGEI-L carries genes involved in pantothenate and biotine synthesis, and may confer auxotrophy to the strains carrying this island. Moreover, genes encoding Co/Zn/Cd efflux pump were present in this GEI. In addition, this island is particularly rich in proteins with GGDEF and EAL domains. The GGDEF or EAL domain proteins are involved in either synthesis or hydrolysis of bis-(3'-5') cyclic dimeric GMP (c-di-GMP), an ubiquitous second messenger in the bacterial world that regulates cell-surface-associated traits and motility [43,44]. Because of the presence of such genes in the vicinity of 2 genes involved in chemotaxis, this island may be important for *Thiomonas* strains to form biofilm, a cellular process involved in resistance to toxic compounds [37]. Indeed, some of these genes are duplicated in CB2 and CB3 and these two strains were shown to develop better biofilm synthesis capacities (Table S2). This island also carries several genes encoding integrases and components of T4SS, such as *virB1*, *virB4*, *trbBCD*, *traCEFGI*, *mob* and a *pilE*-like gene. The presence of such genes suggests that this island originated from an integrative and conjugative element (ICE) that disseminates via conjugation [45]. These observations suggest that this island may be still mobile.

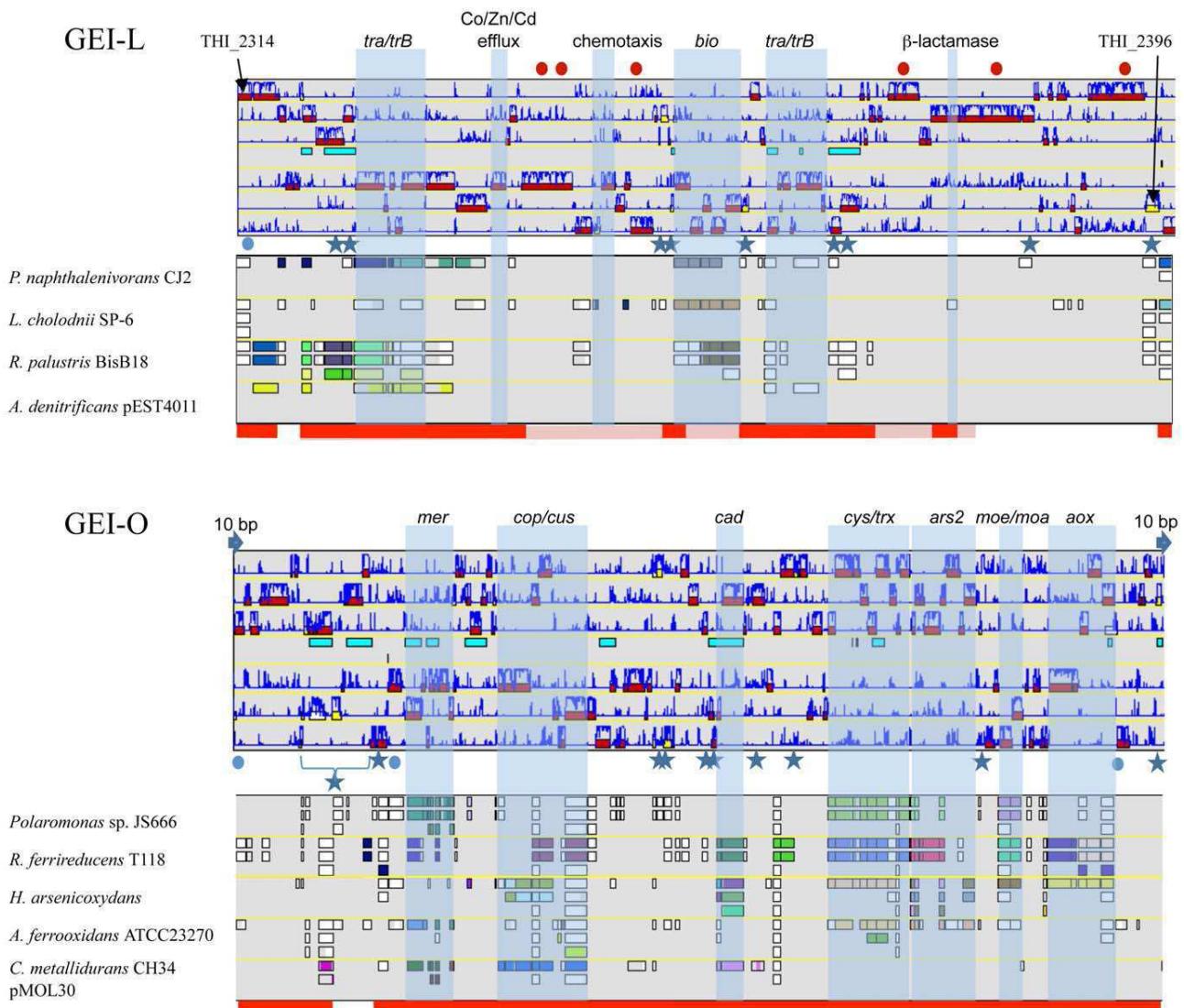
ThGEI-O contains the *aox* and *ars2* genes (Figure 5). In addition, several other genes were found such as *mer*, *cop*, *cus* and *cad* genes involved in mercury, copper and cadmium resistance, respectively, *cys* involved in sulfate assimilation, and *moe/moa* genes involved in molybdenum cofactor biosynthesis as well as genes involved in exopolysaccharide production. The synteny of the genes found in *Thiomonas* sp. 3As ThGEI-O is not conserved in other arsenic-oxidizing bacteria (Figure 5). Several genes present in this region are duplicated in CB1 and CB6 (i.e. the *cop* and *aox* genes), or in CB3 (i.e. *mer*, *cop*, *cus*, *dsb*, *cys*, *ars*, *moe/moa*, *aox*, and *ptxB* genes). Only a single copy of this region is present in CB2 and

3As. PCR amplification and sequencing revealed that this ThGEI-O island is located in a different genomic region in CB2 as compared to 3As. Moreover, the *aox* and *ars* genes found in the ThGEI-O are duplicated in “*Tm. arsenivorans*” but absent in Ynys1 and *Tm. perometabolis*. Indeed, these two strains were unable to oxidize As(III), their As(III) resistance was lower than that of the other strains, and gene PCR amplification of *aox* and *ars2* failed with DNA extracted from these strains (Table S2). Altogether, the presence of at least one copy of these genes in all six strains isolated from arsenic-rich environments (i.e. 3As, CB strains and “*Tm. arsenivorans*”) suggests that this GEI is of particular importance for the growth of *Thiomonas* strains in their toxic natural environment, AMD.

The evolutionary origin of the ThGEI-L and -O was investigated using two different approaches. First, we performed the phylogenetic analysis of the 196 genes contained in these two islands (Table S4, Table S5). The resulting trees revealed that these genes have very different evolutionary histories suggesting that the formation of ThGEI-L and -O islands occurred through the recruitment of genes from various origins by HGT (Table S4, columns 2–5). Interestingly, the closest homologue of 30/75 and 22/121 3As genes, in ThGEI-L and -O respectively, is found in other *Thiomonas* species (mainly *Tm. intermedia*), suggesting that the formation of these islands occurred prior to the diversification of the *Thiomonas* genus and is thus relatively ancient. This hypothesis is supported by the global correspondence analysis (COA) performed on the entire genome. Our results did not reveal any particular codon usage bias, strengthening the hypothesis that these ThGEIs are ancient in *Thiomonas* genus (Figure S3). This may explained why the major genes of these two islands are present in 3As, CB1, CB2, CB3, CB6 and “*Thiomonas arsenivorans*”, as for example, the *ars2* operon and *aox* genes of the ThGEI-O. The phylogenetic analysis of *aox* genes revealed that all *Thiomonas* sequences grouped together with relationships that are very similar to organism relationships inferred with *rpoA* (Figure S4A and S4B). This indicates that these genes were already present in the *Thiomonas* ancestor and vertically transmitted in this genus, but lost in Ynys1 and *Tm. perometabolis*. The phylogenetic analysis of the *arsB* genes, revealed that all *Thiomonas* sequences found in the ThGEI-O (i.e. *arsB2* from 3As, CB1, CB2, CB3, CB6 and “*Tm. arsenivorans*”), grouped together but not with *arsB1* genes that are part of the core genome of *Thiomonas*. Moreover, the evolutionary histories of these two proteins are different: ArsB1 proteins belong in a group containing mainly Alpha-Proteobacteria, whereas ArsB2 seems more closely related to Gamma-Proteobacteria (Figure S4C). These observations revealed that the *ars1* and *ars2* operons were not acquired from the same source or at the same time.

### Discussion

The exploration of the *Thiomonas* sp. 3As genome suggests that this strain has a wide range of metabolic capacities at its disposal. Many of them may make this bacterium particularly well suited to survive in its extreme environment, the acidic and arsenic-rich waters draining the Carnoules mine tailings, as for example biofilm formation and heavy metal resistance. Moreover, some metabolic capacities are unique as compared to another arsenic-resistant bacterium, whose genome has been recently sequenced and annotated, *H. arsenicoxydans*, a strict chemoorganotroph, isolated from activated sludge [38]. The first metabolic idiosyncrasy of *Thiomonas* sp. 3As is its particular carbon and energy metabolic capacities. Indeed, several organic or inorganic electron donors, such as reduced inorganic sulfur compounds [31], could



**Figure 5. Genomic Island ThGEI-O containing genes involved in arsenic metabolism, and ThGEI-L.** The best synteny results of the genes were obtained with genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, *Leptothrix cholinii* SP-6, *Rhodopseudomonas palustris* BisB18, *Achromobacter denitrificans* (ThGEI-L) or *Polaromonas* sp. JS666, *Rhodobacter ferrireducens*, *H. arsenicoxydans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270, and *Cupriavidus metallidurans* CH34 pMOL30 (ThGEI-O). Blue circles: genes originated from phage; Blue stars: transposases; Blue arrows: direct repeats. The genes conserved in 3As and CB strains or in AMD-originated strains (3As, CB strains and “*Tm. arsenivorans*”), are indicated by pink and red lines, respectively. Red dots indicate proteins with GGDEF and EAL domains.  
doi:10.1371/journal.pgen.1000859.g005

be used. Second, some *Thiomonas* strains, i.e. CB1, CB3, CB6 and *Tm. arsenivorans*, carry two copies of the *aox* operon. As far as could be ascertained, this is the first example of *aox* gene duplication. Finally, *Thiomonas* sp. 3As is able to grow at pH 3. Several genes potentially involved in acid resistance were found in *Thiomonas* genome. In addition, the Carnoules toxic environment may cause severe DNA damage in *Thiomonas* sp. 3As, since arsenic is a co-mutagen that inhibits the DNA repair system [41]. DNA repair genes that have been previously shown to be induced in the presence of arsenic in *H. arsenicoxydans* were all found in *Thiomonas* sp. 3As genome, and the expression of *polA* has been shown to be induced in the presence of arsenic [8]. These observations suggest that this bacterium may respond to DNA damage. Nevertheless, we can hypothesize that these stressful conditions may lead to genomic rearrangements in *Thiomonas* genome. This could explain

the important genomic diversity observed among the members of both the 3As species and the *Thiomonas* genus.

At the intra-species level, the dispensable genome defined by comparison of the CB strains with the 3As genome corresponds to 25.3% of *Thiomonas* sp. 3As genome. By comparison, this value is higher than that observed, with the same approach, in other bacteria such as *S. agalactiae* (18%) [46], lower than values calculated in the case of a pathogenic *E. coli* (32.4%) [47], and similar to the value obtained in *Bacillus subtilis* (27%) [48]. The value calculated for *Thiomonas* 3As and CB strains is very high, considering that these strains were isolated from the same site, closely related, and appear to share a recent common ancestor, as illustrated by our phylogenetic analyses. Consequently, we observed that despite strong sequence identities of housekeeping genes such as 16S rRNA or *rpoA*, the whole genome DNA-DNA

hybridization value was relatively low, close to or less than 70%, for strains CB2 and CB3. Conventionally, this should indicate that these bacteria belong to separate evolutionary lineages and must be considered as different species [49]. However, the 16S rRNA-*rpoA* based analysis and CGH experiments revealed that the low DNA-DNA hybridization value correlates with the duplication or absence of several GEIs in these strains. Consequently, we proposed that despite low DNA-DNA hybridization values, these five strains do indeed belong to the same species. Similarly, the DNA-DNA hybridization values obtained with *Thiomonas* sp. 3As as compared to strains Ynys1 and *Tm. perometabolis* were very low, as previously observed [5,10]. Altogether, the great genetic diversity observed in the present study by CGH experiments revealed that DNA-DNA hybridization method may not be appropriate to evaluate evolutionary lineages in *Thiomonas* strains. In this respect the CGH approach seems to be a reliable phylogenetic tool for typing these strains, as suggested in previous studies on other bacteria [47,50].

19 GEIs constitute a large flexible pool of accessory genes that encode adaptive traits. Some of these genes are not required for survival in AMD, since they were not found in all AMD-originated strain genome and correspond therefore to the dispensable gene pool. On the other hand, CGH-based clustering analysis revealed a significant relationship between 3As, CB1-6 and “*Tm. arsenivorans*”, which originate from geographically distinct but similarly arsenic-rich environments. The *Thiomonas* sp. 3As strain and “*Tm. arsenivorans*” form two distinct groups on the basis of phylogenetical, physiological and genetic analyses. Nevertheless, the percent of flexible CDS of *Thiomonas* sp. 3As with “*Tm. arsenivorans*”, is relatively low (18.4%), as compared to the value obtained with Ynys1 and *Tm. perometabolis* (37.9% and 53.6%, respectively). This value obtained with “*Tm. arsenivorans*” was in the same order of magnitude as the value obtained with CB2 and CB3 (23% and 23.6%, respectively). Altogether, 70% of the *Thiomonas* sp. 3As genome was conserved among all strains originated from AMD. Interestingly, two GEIs were conserved or duplicated in all these strains originated from AMD, i.e. ThGEI-O that carries the arsenic-specific operons *ars2* and *aox*, and genes involved in heavy metal resistance, and ThGEI-L that carries several genes involved in heavy metal resistance, biofilm formation and/or motility. Therefore, these GEIs shared by these species are presumably part of the AMD-originated *Thiomonas* core genome. This observation suggests that the acquisition or loss of these GEIs contributes to the evolution of this subgroup of the *Thiomonas* genus and that the evolution of *Thiomonas* strains has been influenced by their similar environments.

Several observations suggest that *Thiomonas* genome evolved by acquiring GEIs through horizontal gene transfer or by genome rearrangement. In the case of two islands, ThGEI-L and -O, an in-depth phylogenetic analysis revealed that these islands have a composite structure probably due to secondary acquisition or losses/rearrangements of some genes. In the case of other GEIs, the existence of HGT is suggested by the fact that genes form syntenic blocks and their GC% were divergent from the rest of the genome. Three mechanisms, i. e. conjugation, transduction and natural transformation, known to be involved in HGT in bacteria [14] may explain GEIs acquisition in *Thiomonas*. One prophage was found in the *Thiomonas* genome and may contribute to horizontal gene transfer, as previously shown in pathogenic bacteria such as *Vibrio cholera*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bartonella* [51–54], Cyanobacteria [55,56] or for the transfer of pathogenic island from *S. aureus* to *Listeria monocytogenes* [57]. In addition, genes encoding Type IV secretion systems (T4SS) were carried by the pTHI plasmid and the ThGEI-L. It has been recently proposed

that GEI-type T4SS are involved in the propagation of GEIs [45,58]. Therefore, it could also be possible that *Thiomonas* acquired such islands by conjugation. Orthologs of *Neisseria gonorrhoeae* genes involved in natural transformation [59] were also found in *Thiomonas* sp. 3As genome, i.e. the *pil* genes encoding a type IV pili components and *comALMP*. This suggests that *Thiomonas* strains are able to acquire exogenous DNA. Finally, several observations suggest that *Thiomonas* genome has undergone genomic rearrangements contributing to its evolution, as illustrated for the two GEIs, ThGEI-L and -O. Such rearrangements may be promoted by repeat sequences or duplications, that are at the origin of recombination [60]. Indeed, repeats sequences represent 7.62% of the *Thiomonas* sp. 3As genome, and some of the loci found in the GEIs are duplicated with high sequence identities, as ThGEI-C and ThGEI-S that are almost identical. In addition, several IS elements are highly similar, sharing more than 70% nucleotide identity. Interestingly, the majority of the ISs present in the *Thiomonas* sp. 3As genome are found in GEIs. This observation suggests that ISs duplication has played a significant role in both assembly and evolution of these islands, or participated in GEI reshuffling. Altogether, conjugation, transduction, natural transformation and recombination may be at the origin of the high genomic content divergence observed among *Thiomonas* strains.

In conclusion, evidences presented here suggest that *Thiomonas* sp. 3As has acquired some of its particular capacities that contribute to its survival and proliferation in AMD by horizontal gene transfer and genomic rearrangement. Furthermore, these data revealed a high degree of genetic variability within the *Thiomonas* genus, even at the intra-species level. Indeed, the analysis of duplications and deletions of GEIs in several strains revealed the huge significance of these GEIs in the evolution of the *Thiomonas* genus, as well as the influence of the natural environment on the genomic evolution of this extremophile. The majority of intra or inter-species comparisons carried out thus far have concerned pathogens. Our analysis shows that GEIs play also an important role in the evolution of environmental isolates exposed to toxic elements.

## Materials and Methods

### Bacterial Strains

*Thiomonas* sp. 3As was obtained from the acidic waters draining the Carnoules mine tailings, southeastern France [5]. *Thiomonas* strains CB1, CB2, CB3 and CB6 were isolated from the same site: briefly, the isolates were purified by repeated single colony isolation on either R2A medium (Difco; strains CB1, CB2 and CB3) or 100:10 medium ([61]; strain CB6). Physiological, phylogenetic and genetic analyses of these four strains were performed as described previously (Tables S2, S6, [8]). Strains *Thiomonas* Ynys1 [62], *Tm. perometabolis* [63] and “*Tm. arsenivorans*” [9] were cultivated as previously described [8]. DNA-DNA hybridization was carried out as described by [64] under consideration of the modifications described by [65] using a model Cary 100 Bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a peltier-thermostated 6×6 multicell changer and a temperature controller with *in situ* temperature probe (Varian).

### DNA Preparation, Sequencing, and Annotation

DNA was extracted and purified from liquid cultures of pure isolates as previously described [8]. The complete genome sequence of *Thiomonas* sp. 3As was determined using the whole-genome shotgun method. Three libraries were constructed, two plasmids and one BAC to order contigs, as previously described [38]. From these libraries, 26,112, 7,680 and 3,840 clones were

end-sequenced, and the assembly was performed with the Phred/Phrap/Conse software package ([www.phrap.com](http://www.phrap.com)), as described previously [38]. An addition of 3,292 sequences was needed for the finishing phase. Coding sequences were predicted as previously described [38]. Putative orthology relationships between two genomes were defined by gene pairs satisfying either the Bidirectional Best Hit criterion or an alignment threshold (at least 40% sequence identity over at least 80% of the length of the smallest protein). These relationships were subsequently used to search for conserved gene clusters (synteny groups) among several bacterial genomes using an algorithm based on an exact graph-theoretical approach [66]. This method allowed for multiple correspondences between genes, detection of paralogy relationships, gene fusions, and chromosomal rearrangements (inversion, insertion/deletion). The ‘gap’ parameter, representing the maximum number of consecutive genes that are not involved in a synteny group, was set to five. Manual validation of automatic annotations was performed in a relational database (ArsenoScope, <https://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/wwwpkgdb/MageHome/index.php?webpage=mage>) using the MaGe web interface [67]. The EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) accession numbers for the genome of *Thiomonas* sp. 3As are FP475956 (chromosome) and FP475957 (plasmid).

### Comparative Genome Hybridization (CGH) Array

A custom 385K array for the *Thiomonas* sp. 3As chromosome and plasmid was designed and constructed by NimbleGen Systems. This DNA array encompasses 3,645 CDS of the 3As genome. Probe length was 50 nt and current mean probe spacing was 7 nt. Genomic DNAs from all strains were extracted with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). DNA samples were labeled and purified using the BioPrime Array CGH Genomic Labeling System protocol (Invitrogen). Test (Cy3-labeled) and reference (*Thiomonas* sp. 3As genomic DNA, Cy5-labeled) genomic DNAs were combined (400 pmol fluorescent dye each) and were co-hybridized to the array for 16 h at 42°C in a MAUI Hybridization System (BioMicro System) and slides were washed according to NimbleGen’s recommendations. Dye swap experiments were used to compare *Thiomonas* sp. 3As and *Thiomonas* sp. CB1 genomic DNAs. Arrays were scanned with an Axon 4000B scanner. Data were acquired and analyzed using NimbleScan 2.0 and SignalMap 1.9 software (Roche, NimbleGen) and analyzed using the Partek Genomics Suite software (Partek Incorporated, St. Louis, Missouri, U.S.A.). Briefly, log<sub>2</sub>-ratios (Cy5/Cy3) were calculated using the segMNT algorithm and gains and losses of genomic material were identified using Partek Genomics Suite Software, as follows: the files were imported and normalized with the qspline normalization [68] by NimbleScan. These data were then imported into the Partek Genomics Suite Soft. The segmentation was performed using the circular binary segmentation algorithm from Olshen *et al.* [69]. Permutations are used to provide the reference distribution to check a second time. 1000 permutations are run using the Partek software. If the resulting p-value is below the threshold ( $p = 0.01$ ), then a breakpoint is added. To verify deletions, PCRs were performed as described in supplementary materials, using primers designed to anneal at the borders of the expected deletions. The CGH data are available in the database ArrayExpress, with the accession number E-MEXP-2260.

### Phage Excision and Electron Microscopy

Phage formation was induced by treating exponential cultures with mitomycin C (0.5 µg/mL) for 24 h. The suspension was negatively stained with 16% ammonium molybdate for 10 seconds

and dried over Formvar-coated nickel grids. Grids were examined at 40,000-fold magnification using a Hitachi 600 transmission electron microscope at 75 kV and photographed using a Hamamatsu ORCA-HR camera (Hamamatsu City, Shizuoka, Japan) with the AMT software (Advanced Microscopy Techniques Corp., Danvers, MA).

### Phylogenetic and Correspondence Analysis

For each CDS, homologues were searched in NCBI databases. The 300 sequences with the best score were aligned using ClustalW [70]. Alignments were checked by hand and positions with more than 5% of gaps were automatically removed. Neighbor-Joining trees were constructed and analyzed to determine the evolutionary origin of each CDS (Table S4). The correspondence analysis (COA) [71] was performed using the library FactoMineR (<http://factominer.free.fr>) from the statistical package R (<http://www.r-project.org>). For all annotated genes of *Thiomonas* sp. 3As, we determined all the relative synonymous codon usage values [72] obtaining a matrix where the rows represent the genes and the 57 columns are the RSCU values for individual codons. As usual, the 3 TER codons were excluded from the analysis. Codons corresponding to Cystein (TGC/TGT) and the duet of Arginine (AGG/AGA) were also removed from the analysis as they induce systematic artefactual biases [73].

### Supporting Information

**Figure S1** Circular representations of *Thiomonas* chromosome and pTHI plasmid. Gene organization found in (A) the *Thiomonas* sp. 3As chromosome. The localisation of the 19 GEIs (A-S) is schematized with grey triangles; (B) the plasmid pTHI. Circles display (from the outside): (1) GC percent deviation (GC window - mean GC) in a 1000-bp window; (2) Predicted CDSs transcribed in the clockwise direction (red); (3) Predicted CDSs transcribed in the counterclockwise direction (blue); (4) GC skew (G+C/G-C) in a 1000-bp window; (5) Transposable elements (pink) and pseudogenes (grey).

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s001 (26.67 MB TIF)

**Figure S2** Duplication of genes found in the several GEIs. Only those with high amino acid identities are shown.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s002 (0.95 MB TIF)

**Figure S3** Factor maps obtained by crossing the first and second axes of the correspondence analysis computed on 3,632 *Thiomonas* sp. 3As genes. For clarity, genes that are not harbored in the 19 GEIs (defined in Table S3) are not represented.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s003 (0.94 MB TIF)

**Figure S4** Phylogenetic trees of arsenic specific genes compared to *rpoA*; blue: gamma-Proteobacteria; brown: Hydrogenophilales; orange: Methylophilales; light green: Nitrosomonadales; deep green: Rhodocyclales; red: Neisseriales; pink: Burkholderiales. (A) *rpoA*; (B) *aoxB*; (C) *arsB*.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s004 (2.19 MB TIF)

**Table S1** List of ISs present in *Thiomonas* sp. 3As genome and plasmid.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s005 (0.05 MB XLS)

**Table S2** Summary of physiological and genetic data obtained from the *Thiomonas* strains used in this study.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s006 (0.04 MB DOC)

**Table S3** Genomic Islands (GEIs) or islets found in the *Thiomonas* sp. 3As genome.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s007 (0.04 MB XLS)

**Table S4** Phylogenetic analysis of the 75 genes contained in the ThGEI-L island.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s008 (0.04 MB XLS)

**Table S5** Phylogenetic analysis of the 121 genes contained in the ThGEI-0 island.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000859.s009 (0.05 MB XLS)

**Table S6** PCR targets and GenBank Accession IDs of strains used in this study.

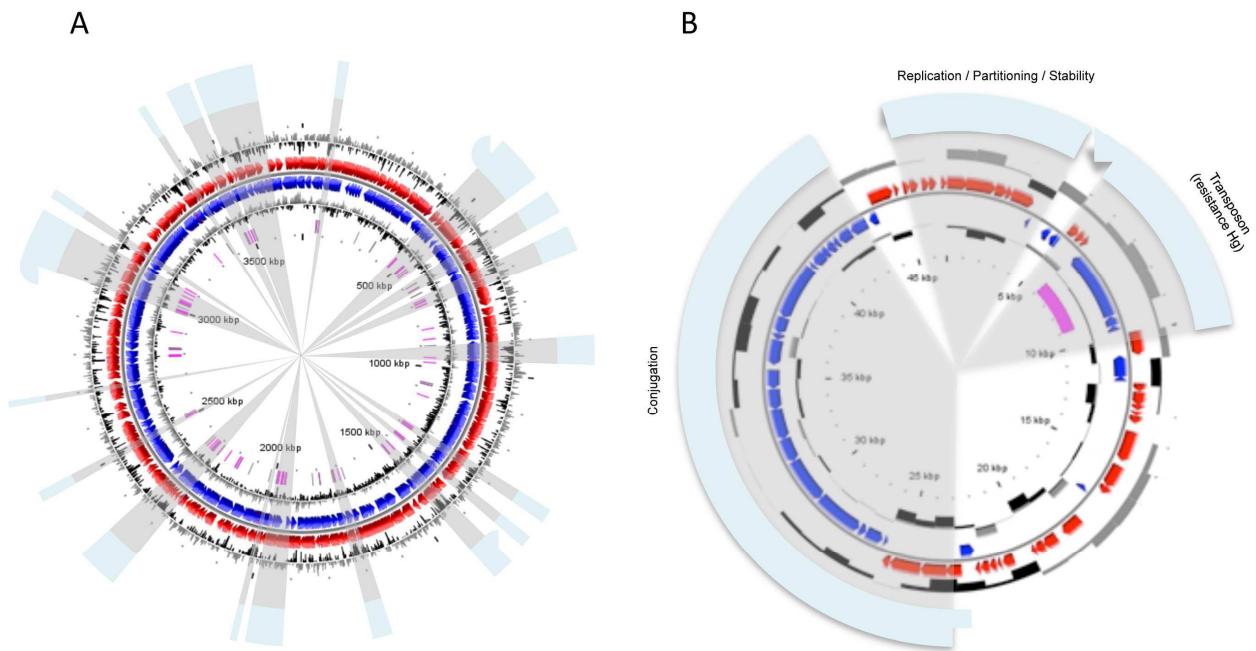
## References

- Johnson DB, Hallberg KB (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Res Microbiol* 154: 466–473.
- Hallberg KB, Johnson DB (2005) Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine. *Sci Total Environ* 338: 53–66.
- Brunel O, Personné JC, Casiot C, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, et al. (2003) Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoules, France). *J Appl Microbiol* 95: 492–499.
- Battaglia-Brunet F, Dictor MC, Garrido F, Crouzet C, Morin D, et al. (2002) An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J Appl Microbiol* 93: 656–667.
- Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, Muller D, Lett MC, et al. (2008) Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ Microbiol* 10: 228–237.
- Coupland K, Battaglia-Brunet F, Hallberg KB, Dictor MC, Garrido F, et al. (2004) Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role of novel *Thiomonas* spp. In: Tsezos AHM, Remondaki E, eds. *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution*. Zografou, Greece: National Technical University of Athens. pp 639–646.
- Moreira D, Amils R (1997) Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 522–528.
- Bryan CG, Marchal M, Battaglia-Brunet F, Klugler V, Lemaitre-Guillier C, et al. (2009) Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiol* 9: 127.
- Battaglia-Brunet F, Joulian C, Garrido F, Dictor MC, Morin D, et al. (2006) Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 99–108.
- Katayama Y, Uchino Y, Wood AP, Kelly DP (2006) Confirmation of *Thiomonas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomonas*. Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2553–2557.
- Hallberg KB, Johnson DB (2003) Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy* 71: 139–148.
- Casiot C, Morin G, Juillet F, Brunel O, Personné JC, et al. (2003) Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoules creek, France). *Water Res* 37: 2929–2936.
- Bentley S (2009) Sequencing the species pan-genome. *Nat Rev Microbiol* 7: 258–259.
- Juhász M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, et al. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* 33: 376–393.
- Maiques E, Ubeda C, Tormo MA, Ferrer MD, Lasa I, et al. (2007) Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *J Bacteriol* 189: 5608–5616.
- Lesic B, Carniel E (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 187: 3352–3358.
- Sentchilo V, Ravatn R, Werlen C, Zehnder AJ, van der Meer JR (2003) Unusual integrase gene expression on the *dc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13. *J Bacteriol* 185: 4530–4538.
- Hacker J, Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 51: 641–679.
- Tettelin H, Riley D, Cattuto C, Medini D (2008) Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr Opin Microbiol* 11: 472–477.
- Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R (2005) The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev* 15: 589–594.
- Achtman M, Wagner M (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol* 6: 431–440.
- Fraser C, Alm EJ, Polz MF, Spratt BG, Hanage WP (2009) The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* 323: 741–746.
- Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, et al. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13950–13955.
- Kettler GC, Martiny AC, Huang K, Zucker J, Coleman ML, et al. (2007) Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genet* 3: e231. doi:10.1371/journal.pgen.0030231.
- Coleman ML, Sullivan MB, Martiny AC, Steglich C, Barry K, et al. (2006) Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science* 311: 1768–1770.
- Costechareyre D, Bertolla F, Nesme X (2009) Homologous recombination in *Agrobacterium*: potential implications for the genomic species concept in bacteria. *Mol Biol Evol* 26: 167–176.
- Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092–1101.
- Schlüter A, Szczepanowski R, Puhler A, Top EM (2007) Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev* 31: 449–477.
- Nascimento AM, Chartone-Souza E (2003) Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res* 2: 92–101.
- Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J (2005) Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol* 8: 253–259.
- Frigard NU, Dahl C (2009) Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv Microb Physiol* 54: 103–200.
- Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA (2009) Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol* 55: 1–79, 317.
- Baker-Austin C, Dopson M (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol* 15: 165–171.
- Sting K, Altendorf K, Bakker EP (2002) Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* 10: 70–74.
- Iyer R, Iverson TM, Accardi A, Miller C (2002) A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature* 419: 715–718.
- Silver S, Phung le T (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 587–605.
- Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ (2007) Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Micro* 5: 928–938.
- Muller D, Médigue C, Koehler S, Barbe V, Barakat M, et al. (2007) A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet* 3: e53. doi:10.1371/journal.pgen.0030053.
- Silver S, Phung LT (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* 71: 599–608.
- Meng YL, Liu Z, Rosen BP (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279: 18334–18341.
- Hartwig A, Blessing H, Schwerdtle T, Walter I (2003) Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology* 193: 161–169.
- Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, Hartwig A (2003) Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis* 24: 967–974.
- Schirmer T, Jenal U (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7: 724–735.
- Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7: 263–273.

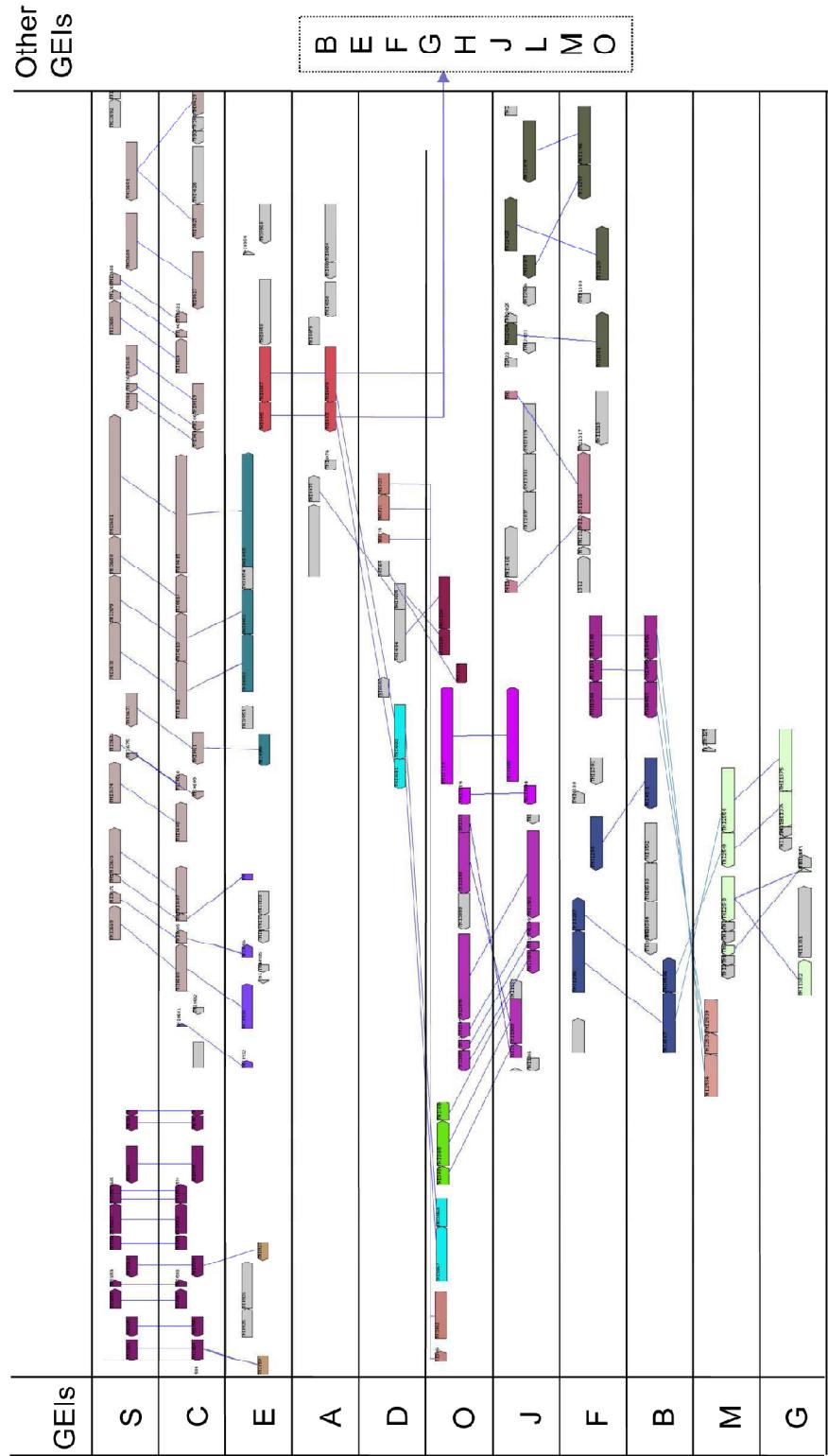


45. Burrus V, Waldor MK (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* 155: 376–386.
46. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, et al. (2002) Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12391–12396.
47. Fukuya S, Mizoguchi H, Tobe T, Mori H (2004) Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains revealed by comparative genomic hybridization microarray. *J Bacteriol* 186: 3911–3921.
48. Earl AM, Losick R, Kolter R (2007) *Bacillus subtilis* genome diversity. *J Bacteriol* 189: 1163–1170.
49. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, et al. (1987) Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37: 463–464.
50. Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, et al. (2006) Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics* 6: 165–185.
51. Li M, Kotetishvili M, Chen Y, Sozhamannan S (2003) Comparative genomic analyses of the *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 69: 1728–1738.
52. Derbise A, Chenal-Francisque V, Pouillot F, Fayolle C, Prevost MC, et al. (2007) A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague *Bacillus*. *Mol Microbiol* 63: 1145–1157.
53. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 560–602.
54. Berglund EC, Frank AC, Calteau A, Vinnere Pettersson O, Granberg F, et al. (2009) Run-off replication of host-adaptability genes is associated with gene transfer agents in the genome of mouse-infecting *Bartonella grahamii*. *PLoS Genet* 5: e1000546. doi:10.1371/journal.pgen.1000546.
55. Dammeyer T, Bagby SC, Sullivan MB, Chisholm SW, Frankenberg-Dinkel N (2008) Efficient phage-mediated pigment biosynthesis in oceanic cyanobacteria. *Curr Biol* 18: 442–448.
56. Zeidner G, Bielawski JP, Shmoish M, Scanlan DJ, Sabehi G, et al. (2005) Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environ Microbiol* 7: 1505–1513.
57. Chen J, Novick RP (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* 323: 139–141.
58. Juhas M, Crook DW, Hood DW (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* 10: 2377–2386.
59. Hamilton HL, Dillard JP (2006) Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* 59: 376–385.
60. Treangen TJ, Abraham AL, Touchon M, Rocha EP (2009) Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiol Rev* 33: 539–571.
61. Schrader JA, Holmes DS (1988) Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 170: 3915–3923.
62. Hallberg KB, Johnson DB (2003) Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy* 71: 139–148.
63. London J, Rittenberg SC (1967) *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic thiobacillus. *Arch Mikrobiol* 59: 218–225.
64. De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 12: 133–142.
65. Huss VAR, Festl H, Schleifer KH (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturations rates. *Syst Appl Microbiol* 4: 184–192.
66. Boyer F, Morgat A, Labarre L, Pothier J, Viari A (2005) Syntons, metabolons and interactons: an exact graph-theoretical approach for exploring neighbourhood between genomic and functional data. *Bioinformatics* 21: 4209–4215.
67. Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, et al. (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res* 34: 53–65.
68. Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berka R, Gautier L, et al. (2002) A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol* 3: research0048.0041–0048.0016.
69. Olslen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M (2004) Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* 5: 557–572.
70. Thompson JD, Plewniak F, Thierry J, Poch O (2000) DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acids Res* 28: 2919–2926.
71. Benézécri JP (1984) L'analyse des correspondances. Paris: Dunod.
72. Sharp PM, Tuohy TM, Mosurski KR (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res* 14: 5125–5143.
73. Perriere G, Thioulouse J (2002) Use and misuse of correspondence analysis in codon usage studies. *Nucleic Acids Res* 30: 4548–4555.

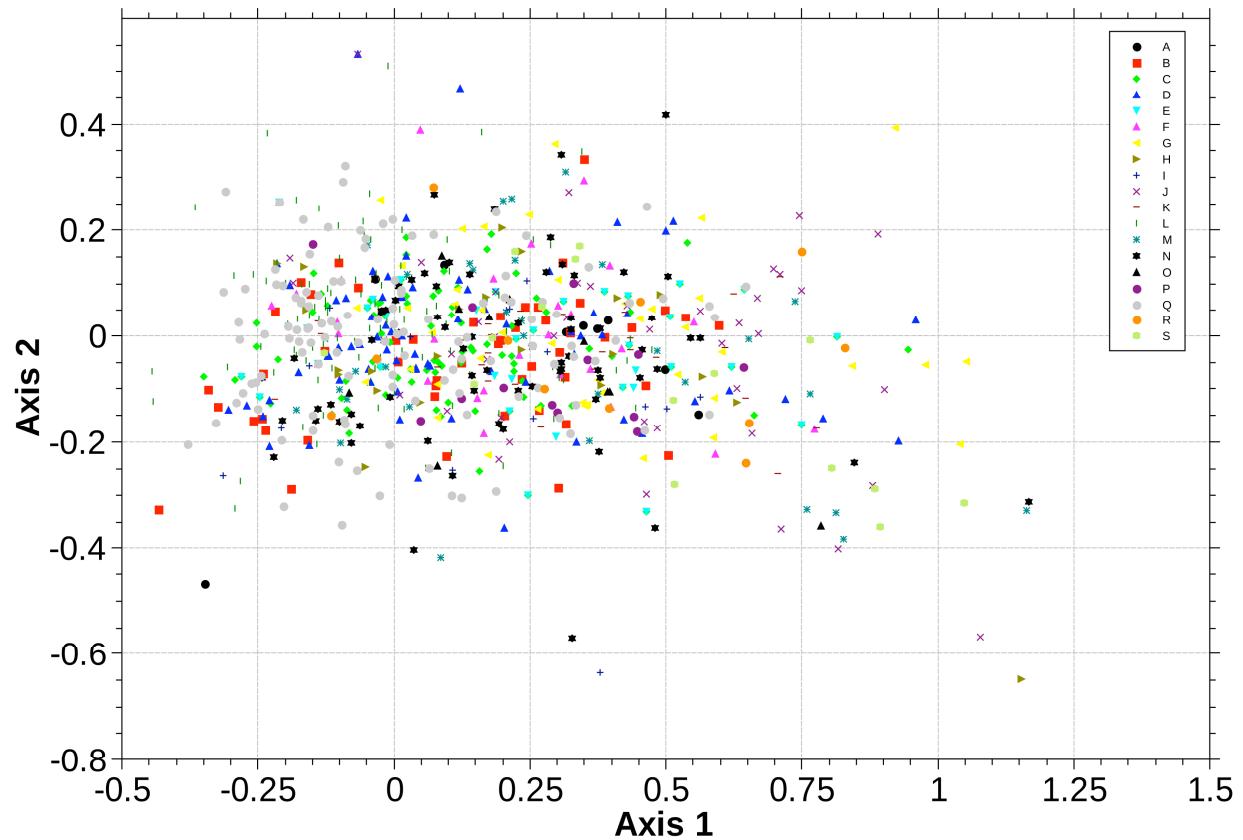
## Supporting Information



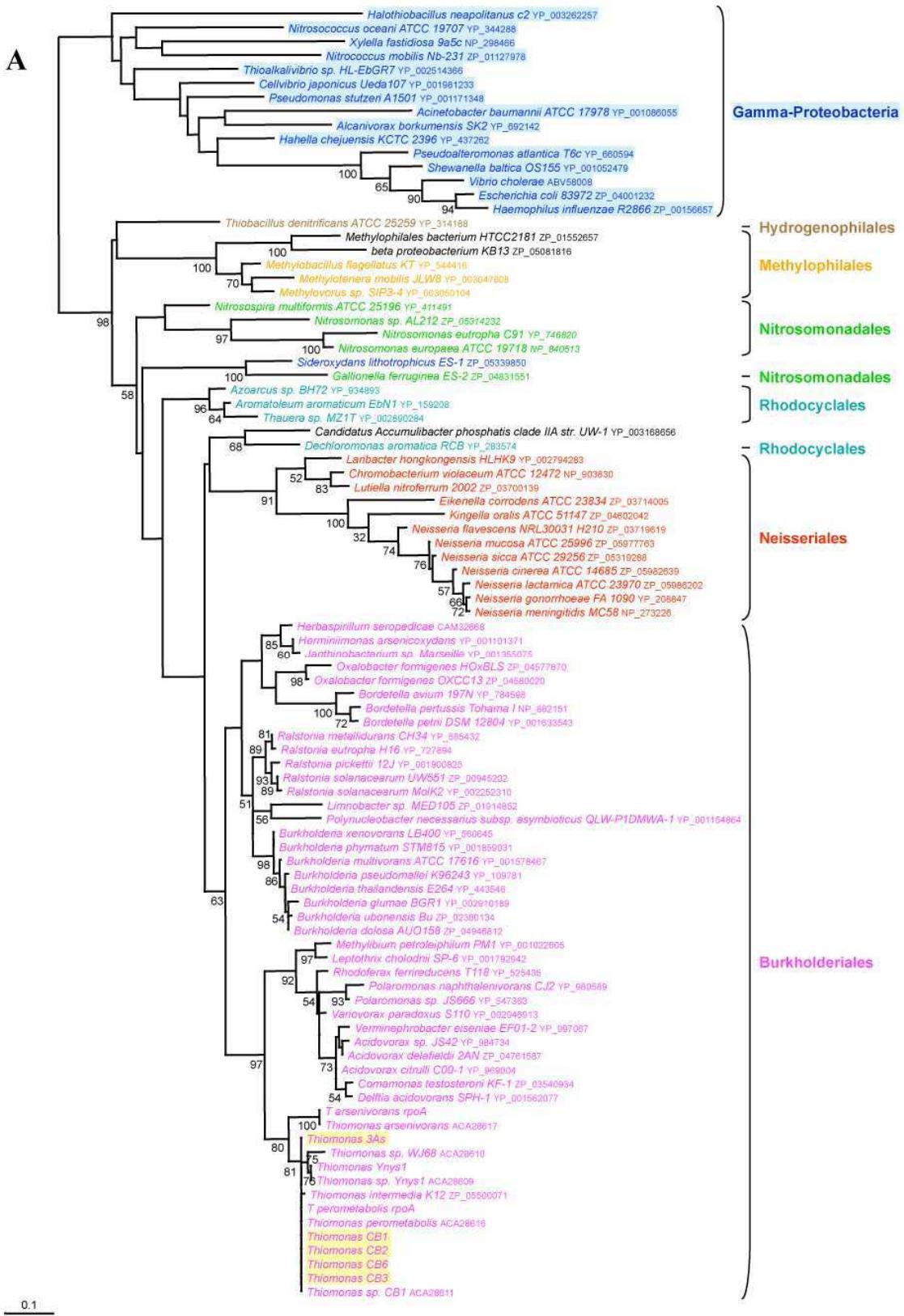
**Fig. S1-** Circular representations of *Thiomonas* chromosome and pTHI plasmid. Gene organization found in (A) the *Thiomonas* sp. 3As chromosome. The localisation of the 19 GEIs (A-S) is schematized with grey triangles; (B) the plasmid pTHI. Circles display (from the outside): (1) GC percent deviation (GC window - mean GC) in a 1000-bp window; (2) Predicted CDSs transcribed in the clockwise direction (red); (3) Predicted CDSs transcribed in the counterclockwise direction (blue); (4) GC skew ( $G+C/G-C$ ) in a 1000-bp window; (5) Transposable elements (pink) and pseudogenes (grey).

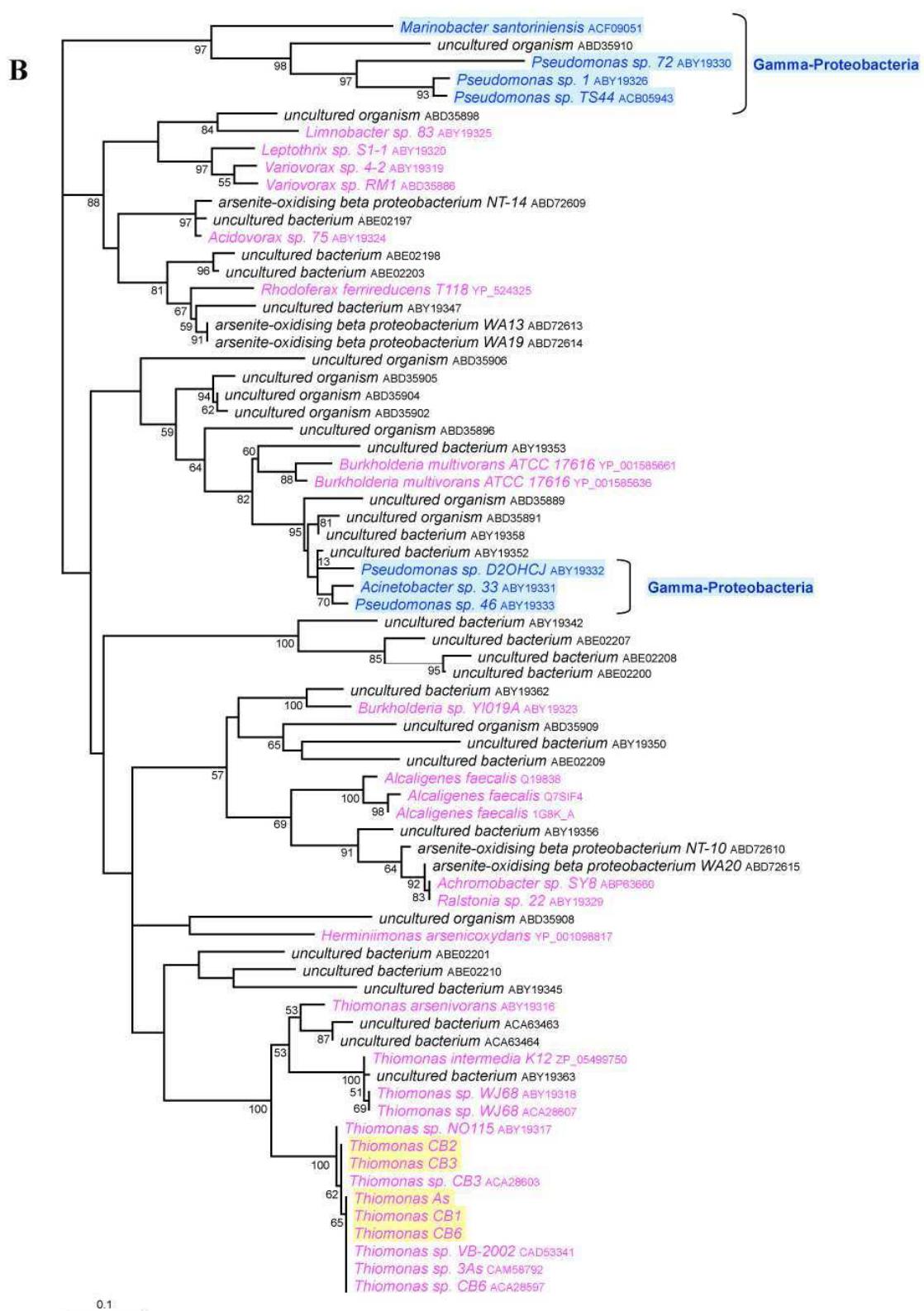


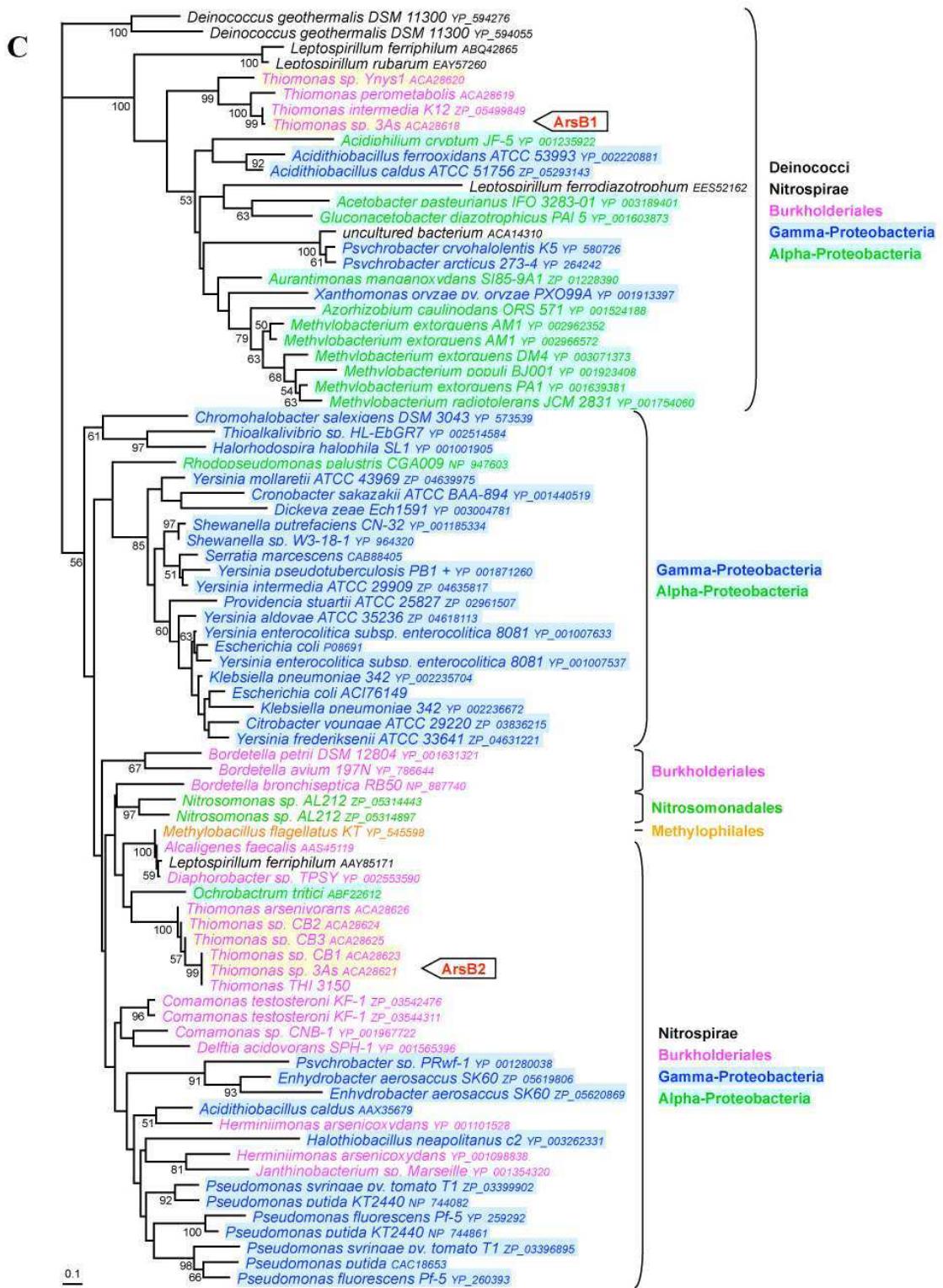
**Fig. S2-Duplication of genes found in the several GEIs. Only those with high amino acid identities are shown.**



**Fig. S3-** Factor maps obtained by crossing the first and second axes of the correspondence analysis computed on 3,632 *Thiomonas* sp. 3As genes. For clarity, genes that are not harbored in the 19 GEIs (defined in Table S3) are not represented.







**Fig. S4-** Phylogenetic trees of arsenic specific genes compared to *rpoA*. blue: gamma-Proteobacteria; brown: Hydrogenophilales; orange: Methylophilales; light green: Nitrosomonadales; deep green: Rhodocyclales; red: Neisseriales; pink: Burkholderiales. (A) *rpoA*; (B) *aoxB*; (C) *arsB*.

Table S1. List of ISs present in *Thiomonas* sp. 3As genome and plasmid

Name	Family	Group	Genome	Plasmid	Total	
			Full	Partial	Full	Total
ISThsp9	Tn3				1	1
ISThsp10	IS21		0	3		
ISThsp11	IS3		1	1		
ISThsp12	IS1634		1	1		
ISThsp13	IS1380		1	1		
ISThsp14	ISL3		1	1		
ISThsp15	[SG30]		1	1		
ISThsp16	IS1182		2	1	3	
ISThsp17	IS1595	ISPha2	1	1		
ISThsp18	IS1182		1	2		
ISThsp19	IS21		2	1	3	
ISThsp20	IS5	IS427	1	1		
ISThsp21	IS5	IS427	1	1		
ISCARN16	IS21		1	1		
ISCARN17	IS21		2	2		
ISCARN25	[SG30]		2	2		
others	IS200/IS605	IS1341	2	2		
	IS5	IS5	3	3		
	IS21		2	2		
	[IS]10	[IS]111	1	1		
	IS5	IS427	2	2		
	IS66		2	2		
	IS1182		2	2		
	IS5		2	2		
	IS110		3	3		
	IS1634		1	1		
	IS3		1	1		
	IS30		1	1		
	IS630		2	7	7	5
	ISL3		1	1		
	IS21		7	14	14	9
	IS3		3	3		
	IS30		1	1		
	IS5	IS427	4	4		
	IS5	IS5	1	1		
	IS5		1	1		
	IS630		3	1	4	4
	IS66		2	7		
	ISL3		1	1		
	IS3		1	1		
	<b>Total</b>		<b>37</b>	<b>51</b>	<b>40</b>	<b>1</b>
	<b>Total</b>		<b>40</b>	<b>51</b>	<b>91</b>	<b>0</b>
	<b>Total</b>		<b>40</b>	<b>51</b>	<b>91</b>	<b>1</b>

Name	Family	Group	Genome			Number of bp corresponding to full IS	% full IS	Number of bp corresponding to partial IS	% partial IS	Total (pb)	Total (% of the genome)
			Full	Partials	Total						
ISThsp1	IS1182		11	11		3738778	98513	263	23735	0,63	122248 <b>3,27</b>
ISThsp2	IS21		2	9	11						
ISThsp3	IS66		3	7	10						
ISThsp4	IS3		2	2		46756	6215	1329	0	0,00	6215 <b>13,29</b>
ISThsp5	IS21		1	1							
ISThsp6	IS5	IS427	2	2							
ISThsp7	IS1634		1	4	5						
ISThsp8	IS1634		1	1							
Family	Group	Members	Full IS copy number	Partial IS copy number	Plasmid	Chromosome	Genome size	Number of bp corresponding to full IS	% full IS	Number of bp corresponding to partial IS	% partial IS
IS110		1	3			IS111					
IS1182		4		13		IS1380					
IS1595	ISPha2	1		1		IS1634		4	6	2	
IS200/IS605	IS1341	1				IS21					
IS3		3				IS3					
IS5		1				IS30		1	1	1	
IS5		1				IS5		4	4	2	
IS5		1				IS5		1	1	3	
IS5		1				IS5		1	1	2	
IS66		2				IS66		2	7	5	
ISL3		1				ISL3		1	1	1	
<b>Total</b>		<b>37</b>				<b>51</b>		<b>40</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	

**Table S2. Summary of physiological and genetic data obtained from the *Thiomonas* strains used in this study**

<i>Thiomonas</i> strains	Oxidation As(III)	MIC (mM)	Arsenic-related gene PCR amplification				Motility <sup>a</sup>	Effect of arsenite on strains motility <sup>b</sup>	Biofilm formation <sup>c</sup> Reference
			As(V)	<i>aoxAB</i>	<i>arsB1</i>	<i>arsB2</i>			
3As	+	>6.0	>50	+	+	+	2.9	0	0.19 ± 0.045 This study and [5]
CB1	+	>6.0	>50	+	+	+	9.1	+ (16%)	0.15 ± 0.039 This study
CB2	+	>6.0	>100	+	+	+	0	nd	0.31 ± 0.015 This study
CB3	+	>6.0	>50	+	+	+	0	nd	0.40 ± 0.094 This study
CB6	+	>6.0	>6	+	+	+	3.1	+ (18%)	0.11 ± 0.032 This study
Ynysl	-	>2.7	>6	-	+	-	5.6	- (35%)	nd [9]
<i>Tm. perometabolis</i>	-	>2.7	>100	-	+	-	0	nd	nd [9]
<i>Tm. arsenivorans</i>	+	>6.7	>50	+	-	+	4.5	+ (24%)	nd [9]

<sup>a</sup> Diameter (mm) of swarming ring formed on 0.3% agar plates after 72 h incubation expressed as a difference with non motile strains (forming colonies of <3 mm diameter);

<sup>b</sup> Motility was tested in the presence of 1.33 mM As(III). “+” indicates a diameter of swarming ring higher than in absence of As(III), “-” a lower one and “0” no difference;

<sup>c</sup> Measured by cristal violet staining after 72 h incubation with 1.33 mM As(III); nd: not determined

Table S3. Genomic Islands (GEIs) or isles found in the *Thiomonas* sp. 3As genome

GEI-Name	Genes Labels	Begin	End	Length	Presence of repeat sequences (size in bp)	Synteny with (ab) of genes <sup>a</sup>	Particular function	Number of extrachromosomal gene (plasmid, transposon or phages)						
								3As	CB1	CB2	CB3	CB6		
A	THI_0076 to THI_10087	73778	34418	9500	nd	Rhodobacter sphaeroides (benzene, shikimate, 12), <i>Burkholderia xenovorans</i> (3490) (acetoin, pgy genes, 11, FET3+ transport, 5), <i>Escherichia coli</i> (NAP, 54 facCin, pgg genes, 7, ETBE degradation, 2), <i>Noramaplex</i> sp. SB155-2 (intermediate metabolism, 8)	genes encoding modififcator/restrictor enzymes	no	3	1	1	0	1	
E	THI_0451 to THI_0537	-66972	546555	80303	nd	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (benzene, shikimate, 12), <i>Burkholderia xenovorans</i> (3490) (acetoin, pgy genes, 11, FET3+ transport, 5), <i>Escherichia coli</i> (NAP, 54 facCin, pgg genes, 7, ETBE degradation, 2), <i>Noramaplex</i> sp. SB155-2 (intermediate metabolism, 8)	Acetoin, benzene metabolism, shikimate pathway, AcetoIn catabolism, degradation of ethyl tert-butyl ester (ETBE), which is a major pollutant from gasoline, Fe <sup>2+</sup> transporter, phenylacetic acid aerobic degradation (paa genes), several genes involved in intermediate metabolism but duplicated in the genome	yes (both sides)	12	1	1	0	1	
C	THI_0591 to THI_0629 (6583-6590?)	394912	41421	4130	nd	<i>Thiomonas</i> sp. 3As (GEI-S), <i>Burkholderia</i> and <i>Pseudomonas</i> strains (3)	genes encoding modification/restriction enzymes, uncinate, hydroxyisobutyrate metabolism	yes	6	1	1	0	1	
D	THI_590 to THI_722	684982	705847	2550	nd	<i>Azotobacter</i> , <i>Thiomonas</i> (ompR), <i>Xanthomonas oryzae</i> , duplication in <i>Thiomonas</i> for glucan biosynthesis [THI_0719-0714], THI_0720 duplicated and synteny conserved with THI_0627 (GEI-C), THI_316 (GEI-O), THI_1710 (GEI-I) and THI_1092	two-component regulator OmpR, <i>cneO</i> , <i>gvac</i> biosynthesis	no	8	1	1	0+	1	
E	THI_0914 to THI_0960	917575	562292	4450	nd	<i>Thiomonas</i> sp. 3As (GEI-C and GEI-S), <i>Burkholderia cereovapacciae</i> (5) and <i>Polaromonas raphaeiflavicans</i> (4)	lysine transport, hydroxysuberate dehydrogenase, DNA polymerase, genes encoding modification/restriction enzymes	yes	5	1	1	0+	1	
F	THI_1296 to THI_1321 [2884-868*] 1309851]	21900	nd	21900	nd	<i>Thiomonas</i> sp. 3As (GEI-D), <i>Burkholderia</i> (3)	genes encoding modififcator/restrictor enzymes	yes	10	1	1	0+	1	
G	THI_1363 to THI_1382 [3527-408*] 136570	9700	nd	136570	9700	<i>Thiomonas</i> sp. 3As (GEI-D), <i>Burkholderia</i> (3)	<i>hicB</i> , argRNA	yes	8	1	1	0	1	
H	THI_1425 to THI_1473	1410074	1451836	41782	yes (17)	-	genes encoding modififcator/restrictor enzymes	yes	11	1	1	0	1	
I	THI_1708 to THI_1740	1695547	1724929	28582	yes (52)	<i>F. dinit</i> (7); <i>R. solanacearum</i> (4)	genes related to quinone sensing, Clavaminic acid synthesis genes	yes	8	1	0	0	0	
J	THI_1916 to THI_2050	1895739	1990824	9500	nd	<i>Mycobacterium variabile</i> (4), <i>A. ferrooxidans</i> (3)	lysogenic bacteriophage, Cd/Zn/Ag resistance (cZnBC)	yes (both sides)	>40	1	1	0	1+	
K	THI_2242 to THI_2275	2004405	2223922	19517	yes (51)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (6), <i>P. neopolitana</i> (5), <i>Nitrobacter</i> plasmid (5), <i>Lepotrix chodatii</i> (5), bovine	genes involved in cobalamin biosynthesis	yes	4	1	1	0	0	
L	THI_2314 to THI_2396	2276244	235490	7870	nd	<i>Nitrobacter</i> plasmid (5), <i>Lepotrix chodatii</i> (5), bovine	<i>kib</i> , <i>nbb</i> , <i>arbB</i> and <i>ra</i> genes (integron conjugative plasmid?)	yes (both sides)	20	1	1	1±	1	
M	THI_2535 to THI_2552	2498528*	2505466*	1050	nd	<i>Synechococcus</i> (3)	Co/Zn/C efflux, pathogenesis, Co/Zn metalloproteins, Co/Zn/C efflux, pathogenesis, Co/Zn metalloproteins, <i>N. metallireducens</i> (5), <i>N. brevis</i> , <i>N. elongata</i> , <i>C. armeniacum</i> , <i>C. neopolitana</i> , <i>A. ferrooxidans</i> , <i>Methylobacter pectiniphilum</i> (9)	Co/Zn/C efflux, pathogenesis, Co/Zn metalloproteins, particularly rich in signal transduction, p-cetam with GGDEF, EAL and/or GAF domains, THI_2337, THI_2338, THI_2343, THI_2355, THI_2380, THI_2394. In several species, proteins containing GGDEF domains have been implicated in biosynthesis of exopolysaccharides, formation of biofilms, establishment of sessile lifestyle, surface motility, and regulation of gene expression. The matrix of GGDEF domain proteins are involved in either synthesis or hydrolysis of cyclic-di-GMP, dimeric GMP (c-di-GMP).	yes	7	1	1	0+	1
N	THI_2731 to THI_2742	2685626	2994791	8100	nd	-	hp <sup>c</sup>	yes	1	1	1	0	1	
O	THI_3148 to THI_3175	2983667	3989089	100422	yes (10)	<i>Pseudomonas</i> (8), <i>Campylobacter metallireducens</i> (5), <i>Neurospora crassa</i> , <i>H. armeniacum</i> , <i>C. neopolitana</i> , <i>A. ferrooxidans</i> , <i>Methylobacter pectiniphilum</i> (9)	ars, nor, nor, cns, cop, ord genes, N/C metabolism, S metabolism (cpv genes), butyrate butanol fermentation	no	21	1	1	1±	1+	
F	THI_3205 to THI_3213	3123642	3130824	6800	nd	-	genes encoding modififcator/restrictor enzymes	yes	2	1	1	2	2	
Q	THI_3458 to THI_3485	3322787	3391152	18355	yes (12)	<i>A. marina</i> , M9(C)1617 (4)	branched-chain amino acid transport system (diplication), phenylacetic acid aerobic degradation (paa genes), ure genes (urease)	no	3	1	1	0	1	
R	THI_3539 to THI_3593	3446527	3499012	4550	nd	several bacteria (a more than 10 genes), <i>Nitrobacter</i> (13), <i>Rhizobius</i> (7), <i>E. coli</i> (paa genes), <i>Klebsiella</i> (12), <i>R. ferrireducens</i> (8)	arazin degradation, clavulanic acid biosynthesis, fatty acid metabolism, urea and nitrate metabolism, transport systems, genes encoding modification/restriction enzymes	yes	5	1	1	0+	1+	
S	THI_3507 to THI_3717	3504235	3515631	111150	nd	<i>Thiomonas</i> sp., 3As (GEI-C), <i>Dyadobacter subtilis</i> (16), <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (9), <i>Burkholderia</i> and <i>Pseudomonas</i> strains (9-14), <i>E. armeniacum</i> (4), <i>Methylotilakococcus</i> (9-14)	Entire genome	yes	7	1	1	0+	1	

<sup>a</sup> Only synteny of more than 3 genes were mentioned; <sup>b</sup> 0 and 0<sup>-</sup>: the entire region is absent or only in part deleted, respectively (dark grey), 2 or 1+: the entire region is duplicated or only in part duplicated, respectively (light grey), 1±: some genes of this region are absent and others are duplicated; <sup>c</sup> hp<sup>c</sup>: hypothetical proteins

Table S4. Phylogenetic analysis of the 75 genes contained in the ThGEI-L island

Gene	Closest relative <sup>a</sup>	Belong in a subgroup composed of <sup>b</sup>	Origin <sup>c</sup>	Global phylogeny <sup>d</sup>	HGT <sup>e</sup>
THI_2314	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_2315	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_2316	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria		Numerous HGT
THI_2317	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria		Numerous HGT
THI_2318				Two homologues only (Alpha and Beta)	
THI_2320				Few homologues in various phyla	
THI_2321	<i>Thiomonas intermedia</i>		?		
THI_2322	<i>Thiomonas intermedia</i>		Proteobacteria		
THI_2323	<i>Acidovorax delafieldii</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Alpha-Proteobacteria		
THI_2324	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues	
THI_2325	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_2326	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_2327					
THI_2328	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Two homologues only	
THI_2329	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues	
THI_2330	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues in other phyla	
THI_2331	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues in other phyla	
THI_2333					
THI_2334	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues in other phyla	
THI_2335	<i>Burkholderia phytofirmans</i> / <i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Homologues found in other proteobacterial and non proteobacterial lineages	
THI_2337	<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> ( <i>Nitrosipirae</i> )	Beta/Alpha-Proteobacteria	?	Homologues found in other proteobacterial and non proteobacterial lineages	Many HGT
THI_2338	<i>Thiomonas intermedia</i>	Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Homologues found also in Delta-Proteobacteria and few other lineages	
THI_2339	<i>Halarhodospira halophila</i>	Beta/Gamma/Delta-Proteobacteria	Proteobacteria	HGT	HGT
THI_2340	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha/Delta-Proteobacteria mixed	?	Homologues found in other proteobacterial and non proteobacterial lineages	Many HGT
THI_2341	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria	Homologues found also in Alpha-Proteobacteria and Eucarya	
THI_2342	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Homologues found also in few Eucarya and Archaea	
THI_2343	<i>Thiomonas intermedia</i>	?	?	Homologues found in various phyla	Many HGT
THI_2344					
THI_2345	3 homologues found in Alpha-Proteobacteria and Cyanobacteria				
THI_2346	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	?	Homologues found in various phyla	Many HGT
THI_2347					
THI_2348	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	No homologues present in other bacterial phyla	
THI_2350	3 Beta-Proteobacteria	?	?	Homologues found in various phyla (mainly Actinobacteria and Firmicutes)	
THI_2351	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Homologues found also in Gamma/Alpha-Proteobacteria	
THI_2352	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Homologues also found in Gamma-Proteobacteria	
THI_2353	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Homologues also found in Gamma-Proteobacteria and in few other phyla	
THI_2354	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Homologues also found in Epsilon-Proteobacteria and in few other phyla	
THI_2355	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Homologues also found in few other phyla	HGT
THI_2356	3 Aquificales			No other homologues detected	
THI_2357		Beta/Gamma-Proteobacteria	?	Homologues also found in few other phyla (mainly Actinobacteria)	HGT
THI_2358	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?	Homologues also found in few other phyla	Mainly HGT
THI_2359					
THI_2361	Beta-Proteobacteria	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria mixed	?	Homologues found in few Actinobacteria	
THI_2362	Beta-Proteobacteria	Few Beta/Alpha-Proteobacteria mixed	?	Homologues found in few Actinobacteria	
THI_2363	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria			
THI_2364	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?	Distant homologues found in other phyla	
THI_2366	Beta/Gamma-Proteobacteria	Mixed Proteobacteria	?	Distant homologues found in other phyla	
THI_2367					
THI_2369					
THI_2370					
THI_2371					
THI_2372	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?	Few homologues also found in Eucarya	
THI_2373	Delta-Proteobacteria	?	?	Homologues found in Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria and Firmicutes/Actinobacteria	
THI_2374	Few Beta/Gamma-Proteobacteria			No homologues present in other bacterial phyla	
THI_2375	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?	Distant homologues found in other phyla	
THI_2376	Beta/Gamma-Proteobacteria mixed	Beta/Gamma-Proteobacteria mixed	?		
THI_2377	<i>Chloroflexi/Lentisphaerales</i>	Mixed bacteria	?		Many HGT
THI_2378	Few Beta-Proteobacteria including <i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	No other homologues detected	
THI_2379	Few Beta-Proteobacteria including <i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Homologues also found in few other phyla	Mainly HGT
THI_2380	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria		Few homologues also found in other bacterial phyla	
THI_2382	Gamma-Proteobacteria	Mixed Proteobacteria	?	Homologues also found in few other phyla	Mainly HGT
THI_2383					
THI_2384					
THI_2385	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?		HGT
THI_2386					
THI_2387					
THI_2388	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?	Homologues also found in few other phyla	HGT
THI_2389					
THI_2390					
THI_2391					
THI_2393					
THI_2394	Mixed <i>Nitrospirae</i> and Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Mixed Nitrospirae and Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Homologues also found in few other phyla	HGT
THI_2395	<i>Thiomonas intermedia</i>	Mixed Proteobacteria	?		HGT
THI_2396	<i>Thiomonas intermedia</i>			3 homologues in Gamma-Proteobacteria	

Lines sharing same colour had a similar evolutionary route; <sup>a</sup>Determination of the closely related sequence to the gene of interest; <sup>b</sup>Composition of the taxonomic group containing the sequence of interest; <sup>c</sup>Non ambiguous evolutive origin of the sequence of interest; <sup>d</sup>Description of the general taxonomy of the homologous sequences; <sup>e</sup>based on the phylogenetic tree

Table S5. Phylogenetic analysis of the 121 genes contained in the ThGEI-0 island

Gene	Closest relative <sup>a</sup>	Belong in a subgroup composed of <sup>b</sup>	Origin <sup>c</sup>	Global phylogeny <sup>d</sup>	HGT <sup>e</sup>
THI_3048	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	?	Few other various bacterial sequences	
THI_3050	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues in other bacterial phyla	
THI_3051	Xanthomonas oryzae/Polaromonas naphthalenivor	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria		Few homologues in various bacterial phyla (mainly Firmicutes)	HGT
THI_3052	Xanthomonas oryzae/Polaromonas naphthalenivor	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Few homologues in various bacterial phyla (mainly Firmicutes)	HGT
THI_3053					
THI_3054	2 Pseudomonas	Beta/Gamma/Delta/Epsilon-Proteobacteria	?	Few homologues in other bacterial phyla and in euka/archaea	Many HGT
THI_3055					
THI_3056					
THI_3057	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria mixed	?		Many HGT
THI_3058					
THI_3059	Few Beta/Gamma-Proteobacteria	?		Few homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3060	2 Thiomonas intermedia			No other homologues	
THI_3062	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_3063					
THI_3065					
THI_3066	2 Beta-Proteobacteria			No other homologues	
THI_3067	Acidovorax sp.	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3068	Acidovorax sp.	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3069					
THI_3070	Leptothrix, Burkholderia	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3071	Bradyrhizobium japonicum	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3072	Thiomonas intermedia	Beta/Gamma-Proteobacteria mixed	Beta/Gamma-Proteobacteria	Homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3073	Gamma-Proteobacteria	Gamma-Proteobacteria		Few Beta/Alpha-Homologues	
THI_3074	Thiomonas intermedia	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	Many HGT
THI_3075	Thiomonas intermedia	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria	No homologues present in other bacterial phyla	
THI_3076	Thiomonas intermedia	Beta/Gamma-Proteobacteria mixed	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3077	2 Alpha-Proteobacteria	1 Beta/2 Gamma-Proteobacteria	?	Homologues found only in 4 Actinobacteria/1 Firmicutes/3Deinococci	
THI_3078	2 Alpha-Proteobacteria	1 Beta/2 Gamma-Proteobacteria	?	Homologues found only in few archaeal methanogens	
THI_3079	2 Alpha-Proteobacteria	1 Beta/2 Gamma-Proteobacteria	?	Many protobacterial homologues/Few non proteobacterial homologues	
THI_3081	Photobacterium profundum	2 Gamma-Proteobacteria/1 Acidobacteria	?	Homologues found also in 2 Cyanobacteria/1 Firmicute/2 Bacteroides	
THI_3082					
THI_3083					
THI_3084	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla (mainly Firmicutes)	Many HGT
THI_3085	Bordetella petri	Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3086	Bordetella petri	Few Gamma/Beta/Epsilon-Proteobacteria	Proteobacteria	2 homologues present in other bacterial phyla	
THI_3087	Thiobacillus denitrificans			No other homologues detected	
THI_3088					
THI_3089					
THI_3090	Burkholderia sp.	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria		
THI_3091	Burkholderia multivorans	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3092	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3093	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3094	Nitrosomonas europaea	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3095					
THI_3096					
THI_3097	Acidithiobacillus ferrooxidans	Beta/Gamma-Proteobacteria	?	Few homologues present in other bacterial phyla (mainly Actinobacteria)	HGT
THI_3098	Delta-Proteobacteria	Few Beta/Gamma/Delta/Epsilon-Proteobacteria	Proteobacteria	Few homologues present in other bacterial phyla	HGT
THI_3099	3 Beta-Proteobacteria	Firmicutes	Firmicutes	Homologues found also in Actinobacteria	
THI_3100	Bordetella petri	Few Gamma/Delta-Proteobacteria ( <i>Desulfovibrio</i> )	Proteobacteria	Few homologues in various other phyla	
THI_3101	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Other homologues in few other phyla	
THI_3102					
THI_3103	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	?	Few homologues in various other phyla	
THI_3104					
THI_3105	Azotobacter vinelandii	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?		
THI_3106	Marinobacter sp. ELB17	Few Beta/Gamma/Alpha-proteobacteria	?		
THI_3107	Luticella nitriferrum	Alpha/Beta-Proteobacteria	?	Archaeal and other bacterial homologues	
THI_3109	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?		
THI_3110	Verminephrobacter Xanthomonas	Beta/Gamma-Proteobacteria	Gamma-Proteobacteria	Few homologues on others bacteria phyla	
THI_3111	2 Burkholderia	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Few homologues on others bacteria phyla	
THI_3112					
THI_3113	1 Delta/1 Alpha-Proteobacteria	Actinobacteria	?	Actinobacteria/Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	
THI_3114	1 Delta/2 Alpha-Proteobacteria	?	?	Present in many bacterial/archaeal/eukaryotes phyla	Many HGT
THI_3115	5 Actinobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	?	Present in many bacterial/archaeal/eukaryotes phyla	Many HGT
THI_3116		Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Present in many bacterial/archaeal/eukaryotes phyla	Many HGT
THI_3117	Beta-Proteobacteria/ <i>Verrucomicobacteria/Chloromycales</i>		Proteobacteria?	Present in few non proteobacterial phyla	
THI_3118	Proteobacteria/ <i>Verrucomicobacteria/Chloromycales</i>		Proteobacteria?	Present in few non proteobacterial phyla	
THI_3119	Pelobacter propionicus	Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_3120	Pelobacter propionicus	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Present in few non proteobacterial phyla	
THI_3121		Beta/Delta-Proteobacteria	?	Present in few non proteobacterial phyla	
THI_3122					
THI_3123	Plesiocystis pacifica	Beta/Delta-Proteobacteria	?	Present in few non proteobacterial phyla	Many HGT
THI_3124	Thiomonas intermedia	2 Beta/2 Delta-Proteobacteria			
THI_3125	Thiomonas intermedia	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_3126	Thiomonas intermedia	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_3127		Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria/Chlorobi	?		
THI_3128					
THI_3129					

THI_3130					
THI_3131	<i>Nitrospirae</i>	Actino/Beta-Proteobacteria	?	Present in few non proteobacterial phyla	Many HGT
THI_3133					
THI_3134	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria?	Present in few non proteobacterial phyla	Many HGT
THI_3135	<i>Methylibium/Lepthotrix</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	
THI_3136	<i>Methylibium/Lepthotrix</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	
THI_3137	<i>Methylibium/Lepthotrix</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria and few other non proteobacterial phyla	
THI_3138	<i>Methylibium/Lepthotrix</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria/Actinobacteria/Bacteroidetes	
THI_3139	<i>Methylibium/Lepthotrix</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria and few other non proteobacterial phyla	
THI_3140	<i>Methylibium/Lepthotrix</i>	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Present in few non proteobacterial phyla	Many HGT
THI_3141	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria		
THI_3142	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta/Alpha-Proteobacteria	Present in many Firmicutes/Bacteroidetes/Chlorobi	
THI_3143	<i>Salmonella/Pseudomonas</i>	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria		
THI_3144	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria	Present in few non proteobacterial phyla (Firmicutes)	Many HGT
THI_3145	Beta/Gamma-Proteobacteria	Few Beta/Gamma-Proteobacteria		Present in few non proteobacterial phyla (Firmicutes, eukaryotes)	Many HGT
THI_3146	Beta/Gamma-Proteobacteria	Few Beta/Gamma-Proteobacteria		Present in few non proteobacterial phyla (Firmicutes, eukaryotes)	Many HGT
THI_3147	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria		
THI_3148	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Few Actinobacteria/Firmicutes/Cyanobacteria	?	Present in few non proteobacterial phyla (Firmicutes, eukaryotes)	Many HGT
THI_3149	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Few Actinobacteria	?	Present in non proteobacterial phyla	Many HGT
THI_3150	<i>Various Thiomonas</i>	Beta-Proteobacteria	?	Present in many bacterial phyla	Many HGT
THI_3151	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria		Many HGT
THI_3152	<i>Thiomonas intermedia</i>	Few Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	?	Present in one Bacteroidetes	
THI_3153					
THI_3154	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Present also in Gamma-Proteobacteria	
THI_3155	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Present also in Firmicutes and few other bacteria	
THI_3156	<i>Thiomonas intermedia</i>	Various bacteria	?		Many HGT
THI_3157	<i>Thiomonas intermedia</i>	No other homologues	No other homologues	No other homologues	
THI_3158	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Proteobacteria	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	
THI_3159	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria	Few homologues present in few other bacterial phyla	
THI_3160	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma/Alpha-proteobacteria/Aquificales			
THI_3161	<i>Thiomonas intermedia</i>	Actinobacteria/Beta-Proteobacteria	?	Few homologues present in Chlorobi/Cyanobacteria	
THI_3162	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta-Proteobacteria?	Homologues present in Bacteroidetes and Aquificales	
THI_3163	<i>Various Thiomonas</i>	Beta-Proteobacteria	Proteobacteria	Present in few non proteobacterial phyla	HGT
THI_3164	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta-Proteobacteria	?	Various bacteria/archaea	
THI_3165	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Alpha-Proteobacteria	Beta/Alpha/Delta-Proteobacteria		Many HGT
THI_3166	<i>Thiomonas intermedia</i>	Beta/Alpha-Proteobacteria	Beta/Alpha/Gamma/Delta-Proteobacteria		Many HGT
THI_3168	<i>Bacillus mycoides</i>	Virus	?	Various bacteria phyla	Many HGT
THI_3169					
THI_3170					
THI_3171					
THI_3172	<i>Ammonifex degensii</i>	Beta/Gamma-Proteobacteria	Beta/Gamma-Proteobacteria	Few homologues	
THI_3173	<i>Thiomonas intermedia</i>	Various bacterial phyla	?		Many HGT/duplications
THI_3174	Few Beta/Gamma-Proteobacteria	Few Beta/Gamma-Proteobacteria	Proteobacteria		
THI_3175	Beta/Gamma/Alpha-Proteobacteria	Various bacterial phyla	?		Many HGT

Lines sharing same colour had a similar evolutionary route; <sup>a</sup>Determination of the closely related sequence to the gene of interest; <sup>b</sup>Composition of the taxonomic group containing the sequence of interest; <sup>c</sup>Non ambiguous evolutive origin of the sequence of interest; <sup>d</sup>Description of the general taxonomy of the homologous sequences; <sup>e</sup>based on the phylogenetic tree

## D. Discussion et conclusion

---

Des souches phylogénétiquement proches peuvent présenter de fortes différences physiologiques, notamment métaboliques, mais également génétiques. Les deux études présentées dans ce chapitre ont eu pour objectif d'identifier et de comparer les mécanismes d'adaptation des différentes souches du genre *Thiomonas* à leur environnement et de déterminer l'impact de ce dernier sur leur contenu génétique.

### I. Métabolismes de l'arsenic et du carbone chez des souches du genre *Thiomonas*

Bien que les cinq souches du genre *Thiomonas* étudiées soient phylogénétiquement très proches, la comparaison de leur physiologie et leurs métabolismes de l'arsenic et du carbone a révélé de grandes différences physiologiques. Ces souches, appartenant à deux groupes phylogénétiques, ont été isolées d'environnements différemment contaminés par l'arsenic (Tableau 1). Alors que les environnements à partir desquels ont été isolées *Tm. arsenivorans*, *Tm. spp. 3As* et *WJ68* contiennent de fortes teneurs en arsenic, *Tm. sp. Ynys1* a été isolée d'un sol faiblement contaminé. La concentration en arsenic des sédiments à partir desquels a été isolée *Tm. perometabolis* n'est quant à elle pas connue.

Les réponses de ces souches à l'arsenic sont apparues très diverses. Tout d'abord, *Tm. perometabolis* et *Tm. sp. Ynys1* ne possèdent pas les gènes *aox* codant l'arsénite oxydase, ce qui est en accord avec les données physiologiques de la littérature. Cette caractéristique est très probablement à mettre en relation avec la résistance moindre de ces deux souches à l'As(III) par comparaison aux trois souches arsénite-oxydantes. D'autre part, la mobilité des cinq souches est affectée différemment par l'As(III), ce qui peut être mis en relation avec la capacité des souches à oxyder l'As(III). En effet, alors que *Thiomonas perometabolis* est non mobile et que la mobilité de *Tm. sp. 3As* n'est pas affectée par

l'As(III), *Tm. arsenivorans* et *Tm. sp.* WJ68, toutes deux arsénite-oxydantes, présentent une induction de la mobilité en présence d'As(III). D'autre part, *Tm. sp.* Ynys1, qui ne possède pas les gènes *aox*, présente une diminution de la mobilité en présence d'arsénite. Ces observations soulignent la fonction de l'arsénite oxydase dans la résistance des cellules à l'As(III) mais soutiennent aussi l'hypothèse selon laquelle cette activité enzymatique a un rôle énergétique.

Afin de comprendre plus en détail le rôle de l'As(III) dans le processus énergétique, les souches *Tm. arsenivorans* et *Tm. sp.* 3As ont été étudiées par des approches de protéomique différentielle en présence ou non d'As(III). Ces deux souches ont été décrites comme étant autotrophes en utilisant l'As(III) comme source d'énergie (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006; Duquesne *et al.*, 2008). Toutefois, dans les conditions de culture de cette étude, seule *Tm. arsenivorans* a été capable de fixer le carbone inorganique en utilisant l'énergie issue de l'oxydation de l'As(III). L'incapacité de *Thiomonas* sp. 3As à pousser dans un milieu minimum pourrait être expliquée par une mutation ou absence d'un gène codant par exemple pour une protéine de synthèse d'un acide aminé ou d'une vitamine et entraînant une auxotrophie. L'approche de protéomique a permis de mettre en évidence de fortes différences métaboliques entre les deux souches. En effet, chez *Tm. arsenivorans* les protéines impliquées dans la fixation du carbone sont accumulées en présence d'As(III) alors que l'inverse a été observé chez *Tm. sp.* 3As. Chez cette dernière les enzymes impliquées dans les métabolismes du carbone (glycolyse et néoglucogenèse) sont aussi moins abondantes en présence d'As(III). Ces observations soutiennent l'idée que *Tm. arsenivorans* est capable de croissance optimale en présence d'As(III) alors que ce composé inhibe la croissance de *Tm. sp.* 3As. Ces résultats corroborent les données physiologiques obtenues dans le cadre de cette étude et soulignent la divergence existante entre les deux souches entre l'assimilation du carbone inorganique et l'utilisation de l'As(III) comme donneur d'électrons.

## II. Comparaison génomique des souches du genre *Thiomonas*

Peu d'organismes sont capables de coloniser les drainages miniers acides (DMAs), qui sont des milieux caractérisés par des pH très bas et de fortes concentrations en sulfates, fer et autres métaux, ainsi qu'en arsenic (Johnson & Hallberg, 2003). Etonnamment, les espèces du genre *Thiomonas* sont souvent retrouvées dans de tels environnements. Afin d'identifier les adaptations spécifiques de ces souches à ces environnements extrêmes, le génome de l'une d'entre elles, *Thiomonas* sp. 3As, isolée du DMA de Carnoulès (Duquesne *et al.*, 2008), a été séquencé et analysé en détail.

L'exploration du génome a, entre autres, révélé la présence de gènes conférant une résistance aux métaux lourds (Cd, Co, Zn, Cu, Ag, Hg), à l'arsenic et à l'acidité. La comparaison par puces CGH du génome de *Thiomonas* sp. 3As avec celui de souches du même genre voire de la même espèce a indiqué que la plupart de ces gènes sont regroupés dans des îlots génomiques. Ces régions, variables d'une souche à l'autre, sont des séquences de 10 à 200 kb, délimitées par des séquences répétées de 16-20 pb. Elles présentent un usage des codons et/ou un pourcentage GC différent du reste du génome et sont souvent insérées entre des gènes codant des ARNt ou similaires. Ces îlots génomiques jouent un rôle fondamental dans la plasticité et l'évolution des génomes bactériens (Juhas *et al.*, 2009). Chez *Thiomonas* sp. 3As, ils représentent 21.5 % du génome. La perte ou l'acquisition de ces régions pourraient expliquer, au moins en partie, les différences phénotypiques observées entre les souches phylogénétiquement proches. Par exemple, la capacité à former des biofilms varie d'une souche à l'autre, *Thiomonas* sp. CB2 et CB3 étant celles qui forment les structures les plus importantes. Ce phénotype pourrait être expliqué par le fait que les gènes impliqués dans la régulation de la mobilité et formation de biofilm sont contenus dans un îlot génomique et sont dupliqués chez ces deux souches. D'autre part, certains îlots génomiques sont retrouvés uniquement chez les souches isolées de DMAs. Ainsi, l'acquisition des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic (gènes *aox* et *ars2*), au Co, Zn

et Cu et de gènes impliqués dans la régulation de la mobilité et formation de biofilm semble correspondre à un mécanisme d'adaptation aux contraintes environnementales des DMAs.

Une région contenant un grand nombre de gènes d'origine phagique a été retrouvée dans certains des génomes. Il a été observé que les souches possédant cette région libèrent des phages filamenteux dans le milieu extérieur en présence de mitomycine, inducteur universel des phages. Cette région semble donc correspondre à un prophage fonctionnel, qui pourrait participer à la dynamique génomique des souches du genre *Thiomonas*.

En parallèle à l'étude de l'adaptation génomique des souches du genre *Thiomonas* aux DMAs, l'interaction des *Thiomonas* avec les autres souches présentes sur le site de Carnoulès a été étudiée par métagénomique. Cette approche a été mise en œuvre sur les sédiments du site et a permis la reconstitution de sept pseudogénomes dont un affilié au genre *Thiomonas*. Un modèle d'interaction entre ce pseudogénome et les autres a été proposé, appuyant de précédentes observations selon lesquelles les souches du genre *Thiomonas* jouent un rôle essentiel dans le processus de bioremédiation naturel qui se déroule dans le DMA de Carnoulès. En effet, leur activité d'oxydation de l'As(III) couplée à l'oxydation biologique et abiotique du fer, permet la précipitation de l'As(V) avec le Fe(III) (Bruneel *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans le modèle d'interaction proposé, les souches du genre *Thiomonas* tirent profit de métabolites (acides aminés et vitamines) produits par des souches ne participant pas directement au processus de bioremédiation. Les résultats de cette étude, à laquelle j'ai participée en réalisant des tests physiologiques, sont présentés sous forme de manuscrit en cours d'évaluation (Annexe : Bertin *et al.*, submitted).

# **CHAPITRE 2. EFFETS DE L'ARSENIC SUR LA CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT DE BIOFILMS**

---

## A. Introduction

---

La deuxième partie de ce travail de thèse repose sur l'étude de l'impact de l'arsenic sur le développement de biofilms bactériens oxydant l'As(III). L'objectif de cette étude est d'identifier la réponse et les mécanismes d'adaptation des biofilms arsénite-oxydants au stress arsénié.

L'initiation et la dynamique des biofilms bactériens sont fortement influencées par les conditions du milieu extérieur, i.e. pH, concentration en oxygène, nutriments, présence de composés toxiques (Goller & Romeo, 2008). En effet, la formation d'un biofilm peut être induite en présence d'antibiotiques (Hoffman *et al.*, 2005). Certains composés bactéricides modifient également la cinétique de développement des biofilms, entraînant par exemple des événements de mort cellulaire localisés ou la dispersion des cellules (Mai-Prochnow *et al.*, 2008; Pamp *et al.*, 2008). L'arsenic, de par sa nature毒ique, est donc fortement susceptible d'influencer la formation et le développement d'un biofilm, ce qui peut jouer un rôle capital lors de processus de bioremédiation. Dans le cadre de cette thèse, la cinétique de développement de deux biofilms bactériens a donc été étudiée en absence et en présence de concentrations subinhibitrices d'As(III).

*Herminiimonas arsenicoxydans*, une β-protéobactérie isolée de boues activées d'une station d'épuration industrielle fortement contaminée par l'arsenic, a été choisie comme souche de référence. En effet, son métabolisme de l'arsenic a déjà fait l'objet de nombreuses études qui ont notamment montré que l'As(III) induit la mobilité flagellaire des cellules et également la synthèse d'une matrice d'exopolysaccharides capable de séquestrer l'arsenic (Carapito *et al.*, 2006; Koechler *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2009). Ces deux mécanismes étant couramment impliqués dans la formation des biofilms, l'hypothèse d'un effet de l'arsenic sur leur développement est d'autant plus probable.

D'autre part, *Thiomonas* sp. CB2, une  $\beta$ -protéobactérie isolée du drainage minier acide de Carnoulès, a été choisie comme représentante du genre *Thiomonas*, présentant un intérêt pour le procédé de bioremédiation, en raison de sa propension plus marquée que les autres souches à former un biofilm (voir **Chapitre 1. Physiologie et génomique de souches du genre *Thiomonas***) (Arsène-Ploetze *et al.*, 2010).

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) a été utilisée pour étudier l'impact de l'As(III) sur le développement de ces deux biofilms car elle permet de garder l'échantillon intact et restitue l'organisation tridimensionnelle des structures, en collectant les informations à chaque plan focal. Des marqueurs fluorescents, extrinsèques ou intrinsèques à l'échantillon, peuvent permettre la visualisation des structures, le suivi du développement du biofilm et de l'état physiologique des cellules (Pamp *et al.*, 2009). Les avantages et les inconvénients de ces techniques sont résumés dans le tableau 2. Dans le cadre de ce travail de thèse, des lectines fluorescentes et des marqueurs de la perméabilité de la membrane ont été utilisés.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont révélé que la cinétique de développement du biofilm des deux souches est affectée par l'As(III) mais à des niveaux différents (Article 3 : Marchal *et al.*, 2010 et manuscrit en cours de préparation). En effet, alors que l'As(III) n'affecte que les premières étapes de la formation du biofilm d'*H. arsenicoxydans*, toute la dynamique structurelle du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 est modifiée. Afin de déterminer plus précisément les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du biofilm d'*H. arsenicoxydans* induits par l'As(III), des mutants, déficients au niveau de leur motilité flagellaire ou de leur activité arsénite oxydase, enzyme clé du métabolisme de l'As(III), ont été utilisés. Quant aux résultats présentés pour *Thiomonas* sp. CB2, ils décrivent l'ensemble des modifications de la dynamique structurelle du biofilm liées à l'As(III). Ils s'appuient essentiellement sur des marquages différentiels des composants du biofilm, car, à ce jour, aucune technique de mutagénèse n'a pu être appliquée à cette souche.

Technique	Avantages	Inconvénients
<b>Activité respiratoire (coloration au CTC)</b>	Le signal fluorescent fort et stable permet la localisation des activités respiratoires. La préparation de l'échantillon est minimale.	Ce marquage ne permet de détecter que l'activité respiratoire. De plus il est destructif.
<b>Coloration différentielle en fonction de la perméabilité de la membrane</b>	Ce marquage permet d'évaluer l'intégralité de la membrane des cellules individuelles, et de facilement visualiser l'effet d'un composé毒ique sur le biofilm.	De nombreux artefacts existent. Il est nécessaire de calibrer la coloration pour chaque souche et condition de culture.
<b>Activité de synthèse des acides nucléiques</b>	Le signal fluorescent est fort et stable et la préparation de l'échantillon est minimale.	Ce marquage permet uniquement de mettre en évidence l'activité de synthèse des acides nucléiques et est destructif.
<b>Gènes rapporteurs</b>	Ce type de marquage ne nécessite pas d'ajout de réactif exogène et est de ce fait non destructif. L'échantillon peut être observé au cours du temps. De nombreuses activités métaboliques peuvent être suivies de cette manière, même simultanément grâce à des codes couleurs.	Les souches d'intérêt doivent être génétiquement manipulables. L'énergie nécessaire à la synthèse des protéines fluorescentes peut affecter la physiologie de la cellule. La fluorescence des protéines peut être affectée par les conditions de pH et d'oxygène.
<b>Marquage des éléments extracellulaires par des lectines fluorescentes</b>	Les lectines sont des marqueurs très spécifiques. De plus, grâce à des codes couleur, il est possible de visualiser simultanément différents types de polysaccharides.	Les lectines ne pénètrent pas l'intégralité du biofilm. Il n'est pas toujours possible de trouver la lectine spécifique du polysaccharide d'intérêt.

**Tableau 2.** Avantages et limites des techniques de marquage des biofilms (d'après Stewart and Franklin, 2008).

**B. Impact de l'arsénite sur l'initiation du biofilm d'*Herminiumonas arsenicoxydans***

---

**Article 3 :**

**Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in  
*Herminiumonas arsenicoxydans***

M. Marchal, R. Briandet, S. Koechler, B. Kammerer, P. N. Bertin

*Microbiology*, 2010, **156**: 2336-2342

## Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in *Herminiimonas arsenicoxydans*

M. Marchal,<sup>1</sup> R. Briandet,<sup>2</sup> S. Koechler,<sup>1</sup> B. Kammerer<sup>1</sup> and P. N. Bertin<sup>1</sup>

Correspondence  
P. N. Bertin  
philippe.bertin@unistra.fr

<sup>1</sup>Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR7156 CNRS & Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>INRA, UMR1319 MICALIS, Massy, France

*Herminiimonas arsenicoxydans* is a Gram-negative bacterium able to detoxify arsenic-contaminated environments by oxidizing arsenite [As(III)] to arsenate [As(V)] and by scavenging arsenic ions in an extracellular matrix. Its motility and colonization behaviour have been previously suggested to be influenced by arsenite. Using time-course confocal laser scanning microscopy, we investigated its biofilm development in the absence and presence of arsenite. Arsenite was shown to delay biofilm initiation in the wild-type strain; this was partly explained by its toxicity, which caused an increased growth lag time. However, this delayed adhesion step in the presence of arsenite was not observed in either a swimming motility defective *fliL* mutant or an arsenite oxidase defective *aoxB* mutant; both strains displayed the wild-type surface properties and growth capacities. We propose that during the biofilm formation process arsenite acts on swimming motility as a result of the arsenite oxidase activity, preventing the switch between planktonic and sessile lifestyles. Our study therefore highlights the existence, under arsenite exposure, of a competition between swimming motility, resulting from arsenite oxidation, and biofilm initiation.

Received 1 March 2010  
Revised 28 April 2010  
Accepted 29 April 2010

## INTRODUCTION

For many years human activities have resulted in a huge accumulation of toxic elements in the biosphere, including heavy metals and metalloids. These elements, unlike most organic contaminants, are not degradable, leading to their persistence in the environment. Metallic pollution of waters has also gradually become a major concern worldwide, and particular attention has been given to arsenic, one of the most toxic elements among the metalloids and metallic ions currently found in the environment. This metalloid can have multiple health effects, including diabetes, hypertension and skin lesions. Furthermore, long-term exposure has been associated with the development of skin and internal cancers (Abernathy *et al.*, 1999).

Inorganic forms of arsenic are the dominant species in waters, arsenite [As(III)] being considered as more toxic than arsenate [As(V)] (Oremland & Stoltz, 2003). The financial and ecological costs of the chemical techniques currently used to remove arsenic from waters prompted the development of biological processes (Lièvremont *et al.*,

2009). In this respect, bacteria possessing the arsenite oxidase enzyme, which oxidizes As(III) to the less toxic and also less soluble form As(V), are of particular interest. *Herminiimonas arsenicoxydans* is an arsenite-oxidizing bacterium originally isolated from the activated sludge of an industrial water treatment plant contaminated with heavy metals and arsenic (Muller *et al.*, 2006). This Gram-negative bacterium is also able to scavenge arsenic in an exopolysaccharide matrix (Muller *et al.*, 2007). Both properties make *H. arsenicoxydans* of particular interest for use in bioremediation.

Physiological tests and proteomic analyses have revealed that the colonization abilities of *H. arsenicoxydans* are specifically affected by As(III) under planktonic growth conditions. As(III) was shown to induce both motility and the synthesis of extracellular polysaccharides (Muller *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2009), known to play a role in biofilm formation and development. Extracellular polymeric substances (EPS) can mediate adhesion to surfaces and cohesion of biofilm structures, representing the matrix in which bacteria are embedded (Flemming & Wingender, 2001). Moreover, EPS are known for their protective role against various bactericidal compounds, including metallic ions (Harrison *et al.*, 2007). In particular, they have been shown to trap arsenic ions in *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007).

Abbreviation: CLSM, confocal laser scanning microscopy.

Two supplementary tables and two supplementary figures are available with the online version of this paper.

The relationship between biofilm and flagellar motility is diverse among bacterial species, and motility can be involved at different levels (Verstraeten *et al.*, 2008). Firstly, motility can play an essential role in biofilm formation, promoting adhesion to the surface (Pratt & Kolter, 1998), biofilm maturation (Klausen *et al.*, 2003a, b; Todhanakasem & Young, 2008) and/or dispersal processes (Sauer *et al.*, 2002; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000). Flagellar motility can also compete with biofilm formation when bacteria have to select between sessile and planktonic lifestyles, both processes involving similar pathways and being regulated by environmental factors (Verstraeten *et al.*, 2008).

Even though the role of motility in the early stages of biofilm formation is difficult to predict, a good knowledge of the colonization behaviour of a strain is essential to develop a bioremediation strategy. The aim of the present study was to explore both biofilm initiation and development in *H. arsenicoxydans* and to elucidate the role of motility and the effects of arsenite in these steps. For this purpose, biofilm formation of the wild-type strain, a  $\Delta fliL$  mutant affected in its swimming properties (Muller *et al.*, 2007) and an  $\Delta aoxB$  mutant defective in its arsenite oxidase activity (Muller *et al.*, 2003) was compared using confocal and epifluorescence microscopy in the absence and in the presence of subinhibitory As(III) concentrations. We observed delayed biofilm formation in the presence of arsenite in the wild-type strain, but not in either the motility or the arsenite oxidase defective mutant.

## METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** *Herminiimonas arsenicoxydans*, a  $\beta$ -proteobacterium, was isolated from industrial activated sludge contaminated with heavy metals and arsenic, and shown to be resistant to up to 5 mM As(III) (Weeger *et al.*, 1999). The  $\Delta fliL$  mutant, shown to be defective in swimming motility (Muller *et al.*, 2007), was obtained by in-frame insertion of a mini-Tn5::*lacZ2* in the 88th codon of the *fliL* gene (Carapito *et al.*, 2006). The  $\Delta aoxB$  mutant, defective in arsenite oxidase activity, was obtained by insertion of a mini-Tn5::*lacZ2* in the 335th codon of the *aoxB* gene (Muller *et al.*, 2003). The mini-Tn5::*lacZ2* does not carry transcriptional terminators (de Lorenzo *et al.*, 1990). Strains were cultivated at 25 °C in a chemically defined medium (CDM; Muller *et al.*, 2006). Arsenic was added to the medium to the desired concentration from sterile stocks of 666.7 mM (50 000 p.p.m.) of the metalloid ion in deionized water, from either NaAsO<sub>2</sub> [(As(III))] or Na<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O [As(V)] salts (Prolabo).

**Planktonic growth measurements.** Growth rates were measured in the presence of various arsenic concentrations. Cells were diluted from an exponential culture to an OD<sub>600</sub> of 0.01 on a Spectronic 20 Genesis spectrophotometer. Generation times and lag times were determined by measuring OD<sub>600</sub> as a function of time by using a Tecan Sunrise plate reader. Growth curves were determined with four replicates.

**RNA extraction.** RNA was extracted as previously described (Weiss *et al.*, 2009) from exponential cultures grown at 25 °C for 24 h (OD<sub>600</sub> 0.15 on a Spectronic 20 Genesis spectrophotometer). RNA aliquots were purified with the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) to ensure elimination of genomic DNA. RNA integrity was checked on

an agarose gel and total RNA concentration was determined spectrophotometrically with a Nanodrop.

**RT (reverse transcription)-PCR.** Expression of the *fliM* gene in the  $\Delta fliL$  mutant was checked by RT-PCR in order to confirm that only the *fliL* gene was inactivated by the mini-Tn5 and not the full *fliLMNOPQR* operon. RT-PCRs were performed on 200 ng of total RNA for a total reaction volume of 25 µl using SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. Primers used were as follows: 5'-ACAGGAAGAAGTTGATGCTTTTA-3' and 5'-ATGTACTCGAA-TTCAACCGGATAG-3' (forward and reverse primers, respectively, for the *fliM* gene).

**Assessment of cell wall properties.** The surface properties of the strains were investigated using the MATS (microbial adhesion to solvents) method (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) on 1 ml of an exponential culture (OD<sub>600</sub> 0.15 on a Spectronic 20 Genesis spectrophotometer) harvested and resuspended in 1 ml 150 mM NaCl. Affinity tests were performed in chloroform and hexadecane solvents (Sigma).

**Transmission electron microscopy.** To assess the presence of a flagellum on the bacterial cells, exponential-phase cultures were carefully deposited on Formvar-coated nickel grids, without any staining. Grids were examined using a Hitachi H600 transmission electron microscope at 75 kV and photographed using a Hamamatsu ORCA-HR camera with the AMT software (Advanced Microscopy Techniques).

**Confocal laser scanning microscopy (CLSM).** Cultures were performed in microscopy-quality 35 mm polystyrene dishes (ibiTreat low 35 mm µ-Dish, Ibi, Integrated BioDiagnostics) as follows. Samples (1.5 ml) of growth medium supplemented or not with 0.67 mM As(III) were inoculated with 15 µl of an exponential-phase culture grown to an OD<sub>600</sub> of 0.15 on a Spectronic 20 Genesis spectrophotometer. Incubation was performed at 25 °C under stagnant culture conditions. The medium was renewed every day to avoid growth limitation due to nutrient depletion. Before staining, samples were gently rinsed with 1 ml 150 mM NaCl to remove loosely adherent planktonic cells. Cells were labelled with the cell-permeable dye SYTO9 (Molecular Probes, Invitrogen). A fluorescently labelled lectin, Alexa Fluor 633 conjugated concanavalin A (Molecular Probes, Invitrogen), which selectively binds  $\alpha$ -mannopyranosyl and  $\alpha$ -glucopyranosyl residues, was used to visualize biofilm exopolysaccharides. Fifty microlitres of stock solution of each dye (6 µM SYTO9 and 1 mg Alexa Fluor 633 conjugated concanavalin A ml<sup>-1</sup>) were deposited on the cells for 15 min. Z-stacks of horizontal-plane images of biofilms were acquired with a step of 1 µm using multimodal CLSM (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems) with a  $\times 63$  (1.4 NA) oil-immersion lens. Images were recorded at an excitation wavelength of 488 nm and 633 nm and emission wavelengths from 500 to 530 nm and from 657 to 757 nm for SYTO9 and Alexa Fluor 633 conjugated concanavalin A, respectively. Simulated 3D fluorescence projections were generated using IMARIS 7.0.0 software (Bitplane). The surface coverage was quantified using NIH ImageJ analysis software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A manual threshold was applied to binarize images. For each experiment, six random microscope fields from two replicates were analysed.

**Epifluorescence microscopy.** Cultures for adhesion assays were performed in microscopy-quality 35 mm polystyrene dishes as described above. Attached cells were stained with SYTO9 as described above. Digital images of the attached bacteria were captured at a magnification of  $\times 1000$  under oil immersion using a Leica DM 4000 B epifluorescence microscope equipped with a Leica DFC300 FX digital camera (Leica Microsystems). Images were recorded at an excitation

wavelength of 488 nm and emission wavelengths from 500 to 550 nm. The surface coverage was quantified as described above for CLSM.

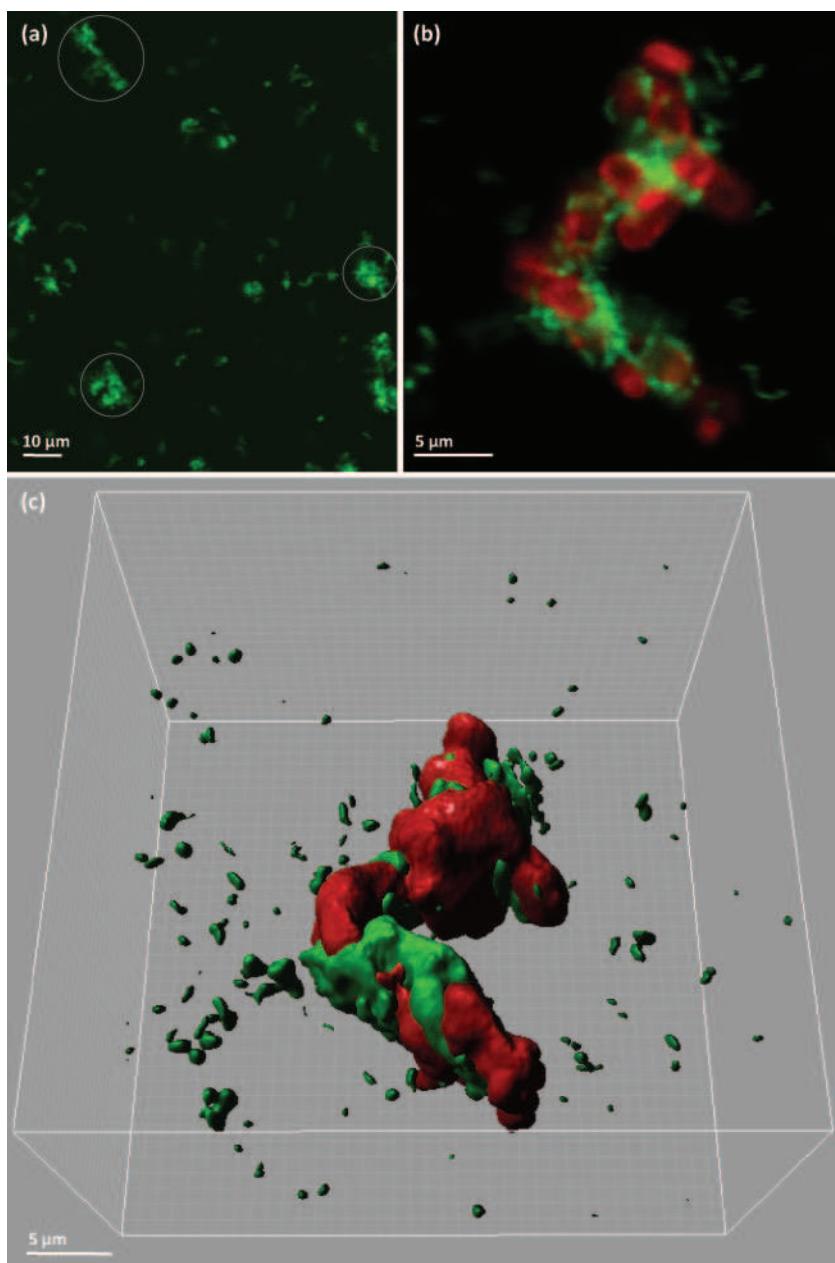
**Statistical analysis.** The ANOVA test was used for comparing strain growth parameters, adhesion to solvents and evaluating the strain surface coverage. Significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

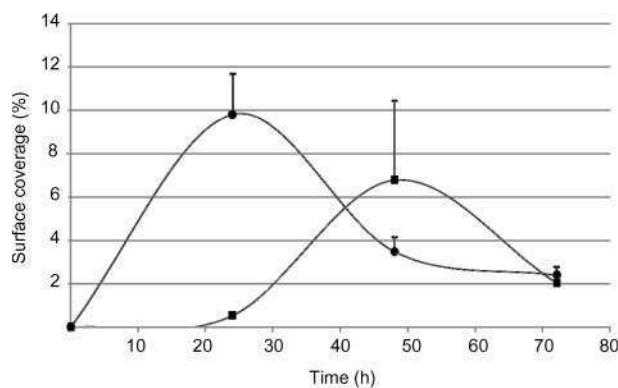
### Three-step biofilm development in *H. arsenicoxydans*

To investigate biofilm formation in *H. arsenicoxydans*, the strain was cultivated in microscope-quality 35 mm

polystyrene dishes, in static conditions. Biofilm development was followed using multimodal CLSM. The cells were stained with SYTO9 and the polysaccharides surrounding the cells were marked with Alexa Fluor 633 conjugated concanavalin A (ConA). This double staining highlighted, after 24 h incubation, small microcolonies ( $7.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$  height) formed by globular structures of a saccharidic nature, i.e. marked by the ConA, around which bacterial cells aggregated (Fig. 1). In parallel, the biofilm surface coverage was measured as a function of time (Figs 2 and 3; see also Supplementary Table S1, available with the online version of this paper). The same surface coverage results were obtained using epifluorescence microscopy (data not shown). This approach highlighted a three-step



**Fig. 1.** Four-day-old biofilm of *H. arsenicoxydans*. (a) Single section of the biofilm surface coverage. Examples of microcolonies, small bacterial aggregates, are circled. (b) Single section of a microcolony. (c) Isosurface view of the microcolony depicted in (b) by IMARIS 7.0.0 software. CLSM images were acquired with optical section separation (z-interval) of 1  $\mu\text{m}$ . The IMARIS reconstruction was obtained from a 15-section stack. Cells were stained with SYTO9 (green) and the extracellular matrix with Alexa Fluor 633 conjugated concanavalin A (red).



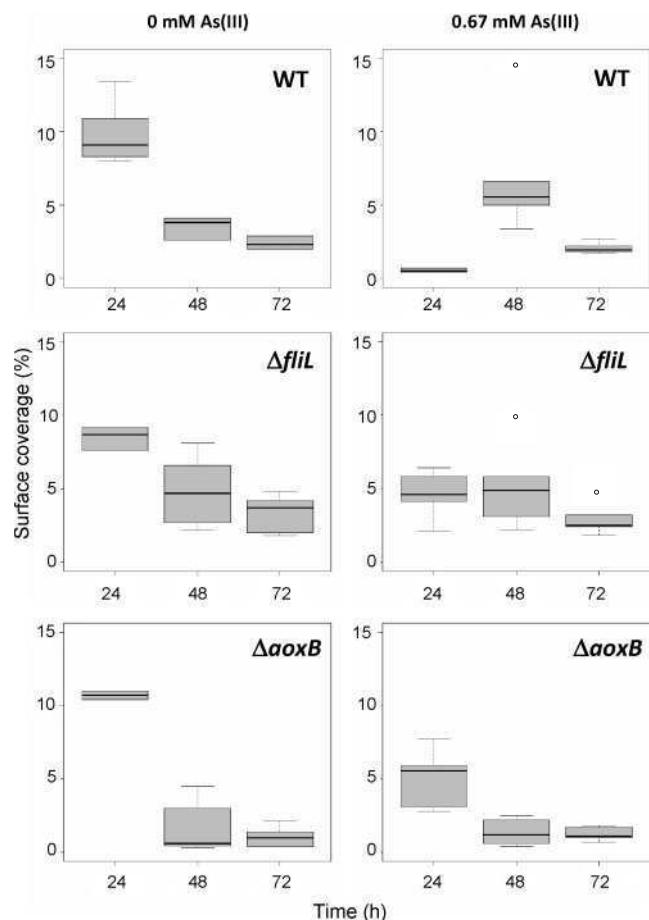
**Fig. 2.** *H. arsenicoxydans* biofilm surface coverage as a function of time. Cultures were performed in the absence of arsenic (●) and in the presence of 0.67 mM As(III) (■). The values are means + 1 SD for data from six images (three images from two replicate biofilms). NIH ImageJ analysis software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) was used to assess surface coverage by the cells stained with SYTO9.

biofilm development, i.e. the attachment of the cells to the surface, the formation of small globular structures and the biofilm detachment 48 h later. Some microcolonies remained on the surface after 72 h.

#### Involvement of motility in the surface colonization process

The biofilm formation of a  $\Delta fliL$  mutant, defective in swimming motility, was investigated in order to assess the role of flagellar motility in *H. arsenicoxydans* biofilm development. This mutant was obtained by in-frame insertion of a mini-Tn5::*lacZ2* in the 88th codon of the *fliL* gene, and *fliL* transcription has been previously shown to be induced under arsenite stress. This gene being the first gene of the *fliLMNOPQR* operon, the presence of *fliM* transcripts in the *H. arsenicoxydans*  $\Delta fliL$  mutant was verified by RT-PCR (data not shown), ensuring that this insertion did not affect the transcription of other operon genes, consistent with the fact that the mini-Tn5::*lacZ2* has no transcriptional terminators. The presence of a flagellum, which influences the membrane properties of the cell, was confirmed by transmission electron microscopy (Supplementary Fig. S1). The surface properties of the  $\Delta fliL$  mutant were also unaffected by the mutation (Supplementary Table S2). Furthermore, the mutation did not affect the planktonic growth of the strain (Table 1).

The biofilm development of the  $\Delta fliL$  mutant was followed by CLSM. Globular microcolonies, similar to those observed in the wild-type strain biofilm, were present and the surface colonization kinetics appeared to be similar to that of the wild-type strain (Fig. 3, Supplementary Table S1 and data not shown). The same surface adhesion results were obtained using epifluorescence microscopy (data not shown). Based on these observations, we concluded that, in



**Fig. 3.** Biofilm surface coverage of the wild-type strain (WT) and the  $\Delta fliL$  and  $\Delta aoxB$  mutants in the absence or presence of 0.67 mM As(III). The data are depicted as box plot diagrams. Box plots portray median, quartiles, adjacent values and outlying values for data from six images (three images from two replicate biofilms). In the absence of arsenite, the three strains displayed a similar adhesion behaviour. In the presence of As(III), the surface adhesion after 24 h of culture was higher in the  $\Delta fliL$  and  $\Delta aoxB$  mutants ( $P < 0.05$ ).

the absence of arsenite, swimming motility does not act, positively or negatively, in *H. arsenicoxydans* biofilm development.

#### Effect of arsenite on biofilm development

We then investigated *H. arsenicoxydans* biofilm formation under arsenite stress. The biofilm structure, i.e. the globular microcolonies, of the wild-type strain was not affected by As(III) (data not shown). However the three-step biofilm development was delayed by 24 h (Fig. 2, Fig. 3 and Supplementary Table S1), even when the strain was pre-cultivated with As(III) (data not shown). The same surface coverage results were obtained using epifluorescence microscopy (data not shown). In order to explain this observation, the planktonic growth of the strain was

**Table 1.** Growth parameters of the wild-type strain (WT) and  $\Delta fliL$  and  $\Delta aoxB$  mutants as a function of arsenite concentration

Strain	Growth parameter*	Arsenite concentration (mM):	
		0	0.67
WT	g (h)	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.0
	L (h)	1.5 ± 0.9	13.4 ± 0.9
$\Delta fliL$	g (h)	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.1
	L (h)	2.7 ± 0.1	14.3 ± 0.9
$\Delta aoxB$	g (h)	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.3
	L (h)	2.5 ± 0.4	10.9 ± 1.4

\*g, generation time; L, lag time.

followed in the absence and in the presence of 0.67 mM As(III) (Table 1). The results showed a marked increase in lag time in the presence of arsenite, from 1.5 h to about 13 h; this was seen even when the strain was pre-cultivated with 0.67 mM As(III) (data not shown). This observation could partly explain the delayed surface colonization in the presence of arsenite.

### Role of motility in biofilm initiation in the presence of arsenite

Since As(III) is known to induce swimming motility in *H. arsenicoxydans*, we hypothesized that it could favour swimming instead of surface colonization. To address this hypothesis, we investigated the early stages of biofilm formation of the  $\Delta fliL$  mutant in the presence of arsenite. Indeed, the mutant displayed an adhesion rate at 24 h significantly higher than that of the wild-type strain ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3, Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. S2). The same surface coverage results were obtained using epifluorescence microscopy (data not shown). This adhesion divergence cannot result from a growth rate difference, as the planktonic generation time of the mutant was not significantly different from that of the wild-type strain ( $P > 0.05$ ) (Table 1). Similarly, cell surface properties, known to play a key role in adhesion processes, did not significantly differ between wild-type and mutant strains ( $P > 0.05$ ) (Supplementary Table S2). Taken together, these results were in agreement with our hypothesis that the delayed adhesion of the wild-type strain under arsenite exposure was linked to an induction of swimming motility.

### Induction of swimming motility through arsenite oxidase activity

To test if this swimming motility induction was dependent on arsenite oxidase activity, we investigated the surface colonization behaviour of a  $\Delta aoxB$  mutant. This strain carries a Tn5 transposon insertion in the gene coding for the large subunit of the arsenite oxidase and displays the

wild-type cell surface properties ( $P > 0.05$ ) (Supplementary Table S2). Using epifluorescence microscopy, we showed that, in the absence of arsenite, the mutant exhibited the wild-type surface colonization behaviour. Interestingly, under arsenite exposure, the surface colonization of this mutant was not delayed by 24 h (Fig. 3, Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. S2). Under arsenite stress, this  $\Delta aoxB$  mutant exhibited a planktonic generation time similar to and a lag time of 2.5 h shorter than those of the wild-type strain (Table 1). However, this lag time difference was insufficient to explain the 24 h difference in the surface colonization behaviour between the wild-type strain and the  $\Delta aoxB$  mutant under arsenite exposure. According to these data, we concluded that this colonization difference was correlated with arsenite oxidase activity.

### Effects of As(V) on biofilm initiation

To confirm that the delayed surface adhesion we observed in the presence of As(III) in the wild-type strain was specific to the arsenite oxidase activity and not to the presence of As(V), the final product of the enzymatic activity, we investigated *H. arsenicoxydans* biofilm initiation in the presence of 0.67 mM As(V) using epifluorescence microscopy. Even though this As(V) concentration induced a planktonic lag time of  $13 \pm 0.4$  h similar to that induced by 0.67 mM As(III), its presence did not delay biofilm initiation (Supplementary Table S1). This result supports our conclusion that arsenite oxidase activity, and not As(V), was responsible for the delayed adhesion observed in the presence of As(III).

## DISCUSSION

In the natural environment, most bacteria live in organized surface communities called biofilms. These aggregated cells are embedded in an exopolymeric matrix which protects them against various environmental stresses, e.g. desiccation, oxygen and antibacterial compounds (Costerton *et al.*, 1995; O'Toole *et al.*, 2000). Biofilm formation also represents an important survival mechanism; biofilm-forming strains show increased resistance to antibacterial compounds such as antibiotics and metallic ions. This increased resistance depends on multiple factors, including the physical barrier formed by the exopolymeric matrix (Harrison *et al.*, 2007). The biofilm lifestyle is also advantageous in stressful conditions as compared to the planktonic one. The arsenic-resistant bacterium *H. arsenicoxydans* has been shown to synthesize a thicker exopolysaccharide matrix in the presence of subinhibitory As(III) concentrations (Muller *et al.*, 2007). These transmission electron microscopy observations have been further supported by proteomic and quantitative mRNA analysis, indicating the accumulation of two proteins potentially involved in exopolysaccharide synthesis – a polysaccharide biosynthesis protein CapE (HEAR1147) and a phosphomannomutase producing a precursor for alginate polymerization (HEAR2721) – and a twofold induction of a

gene coding an EpsF-like protein (HEAR0715) in the presence of As(III) (Muller *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2009). As an exopolysaccharidic matrix is often linked to biofilm structures (Flemming & Wingender, 2001), we hypothesized that subinhibitory As(III) concentrations induce biofilm formation in *H. arsenicoxydans*.

The staining used for biofilm exopolysaccharides in the present study did not indicate an increased amount of exopolysaccharide in the presence of As(III), contrary to what has been previously described under planktonic growth conditions (Muller *et al.*, 2007). This result may indicate a difference in regulation of exopolysaccharide synthesis between the two lifestyles. However, in the stagnant culture conditions tested in the present study, even though arsenite did not affect the biofilm structure, we showed that its presence delayed biofilm initiation. The toxic effect of arsenite on growth could partly explain this late adhesion. However, the surface colonization kinetics may also be regulated by other factors, including motility. *H. arsenicoxydans* possesses a polar flagellum and is also capable of swimming motility (Muller *et al.*, 2007). The role of swimming motility in biofilm initiation and development was investigated using a non-motile  $\Delta fliL$  mutant previously obtained by insertion of a mini-Tn5 (Carapito *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2007). The *fliL* gene is the first gene of the *fliLMNOPQR* operon, belonging to the class 2 genes, and encoding flagellar structural proteins implicated in the specification of the basal body and hook structure (Macnab, 2004). We showed that the mutant displays wild-type surface properties, including the presence of a flagellum, which is known to influence the surface properties of the cell and can act as an adhesive appendage (Kirov *et al.*, 2004; Nejidat *et al.*, 2008). In the absence of arsenite, the mutant also exhibited wild-type biofilm formation kinetics. Based on these observations and according to the mutant phenotype, we conclude that in the absence of arsenite, swimming motility has neither positive nor negative effects on *H. arsenicoxydans* biofilm development, a process that may require other motility forms, like twitching (Klausen *et al.*, 2003b). However, our results do not exclude a role of motility in the initiation of this process, i.e. in the switch between planktonic and sessile lifestyle. As *H. arsenicoxydans* swimming motility has previously been shown to be specifically induced by arsenite stress (Muller *et al.*, 2007), we hypothesized that As(III) could favour swimming instead of surface colonization, which would explain the 24 h delay in surface colonization observed in the presence of arsenite. This hypothesis is supported by the fact that, in the presence of As(III), the  $\Delta fliL$  mutant exhibited a prompter initial attachment than the wild-type strain. As the *fliL* gene has been previously shown by  $\beta$ -galactosidase assays and proteomic analysis to be induced in the presence of arsenite, like the swimming motility (Carapito *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2009), we propose that the presence of As(III) favours swimming mobility through the *fliL* gene, resulting in a delayed switch between motile and sessile lifestyles, a transition that is essential in biofilm initiation.

In numerous bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio cholerae*, the switch between motile and sessile lifestyles has been shown to be regulated by a global second messenger, bis-(3',5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) (Barraud *et al.*, 2009; Jonas *et al.*, 2010; Kolter & Greenberg, 2006; Pratt *et al.*, 2007). Its intracellular concentration depends on diguanylate cyclase activities, associated with proteins possessing GGDEF domains, and the c-di-GMP-specific phosphodiesterase activities, linked to proteins presenting EAL domains. High c-di-GMP cellular levels induce biofilm formation while low levels promote cell motility (Hengge, 2009). Transcriptional profiling of *H. arsenicoxydans* has been recently performed under arsenite exposure (Koechler *et al.*, 2010). The transcription of a gene coding for a hypothetical diguanylate cyclase carrying a GGDEF domain protein was found to be significantly inhibited (2.5-fold) in the presence of arsenite (J. Cleiss-Arnold, personal communication). This gene (HEAR1864) is located directly upstream of the cluster II flagellar genes (HEAR1866 to HEAR1904), whose transcription has been shown to be induced by arsenite (Koechler *et al.*, 2010). These observations support our hypothesis, i.e. an induction of swimming motility at the expense of biofilm formation in the presence of arsenite.

Flagellar motility is a process that is also considered as a defence mechanism in hostile environments. It allows bacteria to reach more favourable niches, giving them an ecological advantage (Eberl *et al.*, 1999; Harshey, 2003). However, since As(III) has been previously shown to induce positive chemotaxis in *H. arsenicoxydans*, the fact that motility is induced in this bacterium in the presence of As(III) could not be explained by this hypothesis. Alternatively the arsenite-dependent motility may be the result of arsenite oxidase activity: As(III) has been shown to promote increased motility in *H. arsenicoxydans* wild-type but not in arsenite oxidase defective strains (Koechler *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2007). Indeed, the arsenite oxidase defective mutant tested in the present study did not exhibit delayed adhesion under As(III) exposure. Because in the presence of As(V), the final product of the arsenite oxidase activity, the wild-type strain did not exhibit delayed surface adhesion, we conclude that the delayed biofilm initiation we observed under As(III) exposure was specifically dependent on the arsenite oxidase activity.

In conclusion, our observations show that As(III) has a more complex effect on surface colonization than previously thought. In *H. arsenicoxydans*, flagellar motility plays a key role in the switch between planktonic and sessile lifestyles, inhibiting the initiation of biofilm formation. Surprisingly, under arsenite stress, *H. arsenicoxydans* favours swimming motility, which results from the arsenite oxidase detoxification activity. The swimming motility resulting from this activity may be indicative of an attempt by the cells to transform their environment before they initiate a biofilm.

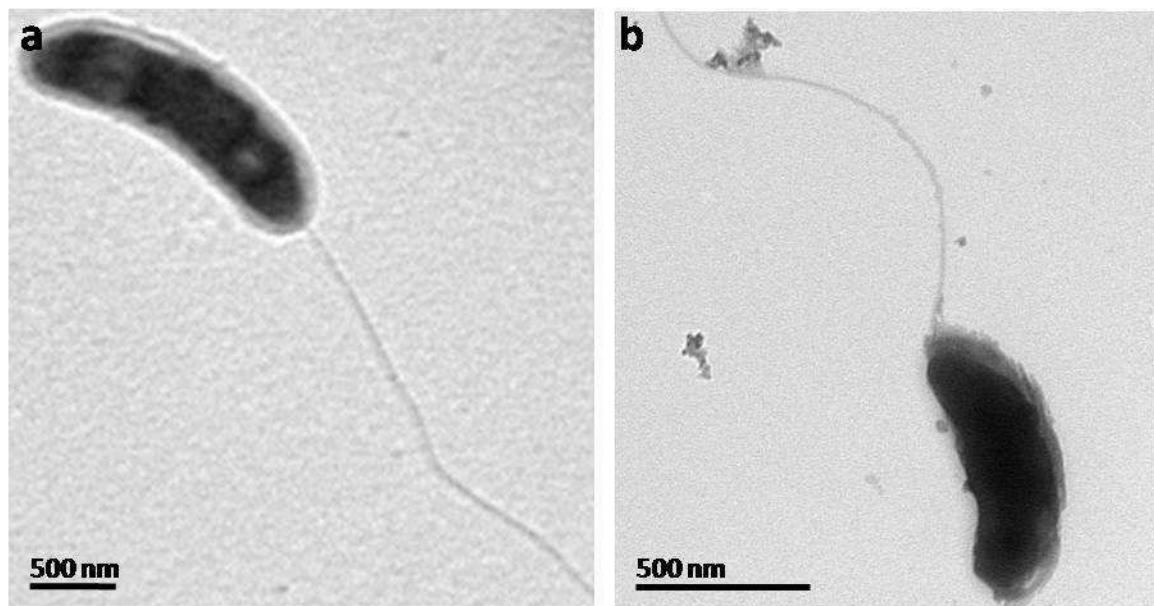
## ACKNOWLEDGEMENTS

CLSM was performed at the MIMA2 Microscopy Platform (INRA, Massy, France) and transmission electron microscopy was performed at the Strasbourg Esplanade Cellular Imaging Facility (Strasbourg, France). M. M. was supported by a studentship from the ANR COBIAS project (PRECODD 2007, Agence Nationale de la Recherche). This work was done in the frame of the ‘Groupement de Recherche – Métabolisme de l’Arsenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS)’ (<http://gdr2909.u-strasbg.fr>).

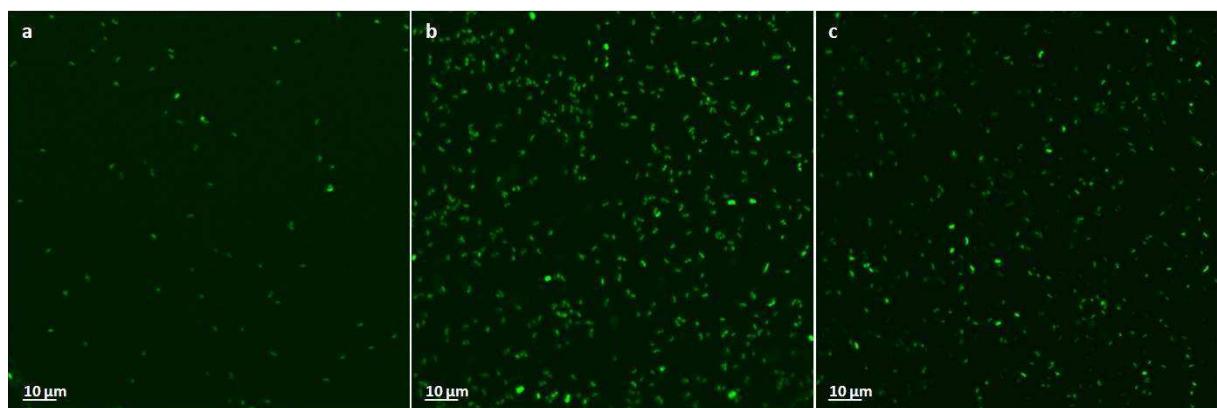
## REFERENCES

- Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D., Aposhian, H. V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T. & other authors (1999). Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect* **107**, 593–597.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2009). Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* **191**, 7333–7342.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **7**, 47–53.
- Carapito, C., Muller, D., Turlin, E., Koechler, S., Danchin, A., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Bertin, P. N. & Lett, M. C. (2006). Identification of genes and proteins involved in the pleiotropic response to arsenic stress in *Caenibacter arsenoxydans*, a metalloresistant beta-proteobacterium with an unsequenced genome. *Biochimie* **88**, 595–606.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711–745.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**, 6568–6572.
- Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**, 1703–1712.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I: structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* **43**, 1–8.
- Harrison, J. J., Cieri, H. & Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**, 928–938.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**, 249–273.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263–273.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U. & Melefors, Ö. (2010). Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environ Microbiol* **12**, 524–540.
- Kirov, S. M., Castrisios, M. & Shaw, J. G. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect Immun* **72**, 1939–1945.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003a). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**, 61–68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003b). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511–1524.
- Koechler, S., Cleiss-Arnold, J., Proux, C., Sismeiro, O., Dillies, M. A., Gouhen-Chollet, F., Hommais, F., Lièvremont, D., Arsène-Pioletze, F. & other authors (2010). Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminium monas arsenicoxydans*. *BMC Microbiol* **10**, 53.
- Kolter, R. & Greenberg, E. P. (2006). Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* **441**, 300–302.
- Lièvremont, D., Bertin, P. N. & Lett, M. C. (2009). Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie* **91**, 1229–1237.
- Macnab, R. M. (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 207–217.
- Muller, D., Lievremont, D., Simeonova, D. D., Hubert, J. C. & Lett, M. C. (2003). Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant betaproteobacterium. *J Bacteriol* **185**, 135–141.
- Muller, D., Simeonova, D. D., Riegel, P., Mangenot, S., Koechler, S., Lièvremont, D., Bertin, P. N. & Lett, M. C. (2006). *Herminium monas arsenicoxydans* sp. nov., a metalloresistant bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1765–1769.
- Muller, D., Medigue, C., Koechler, S., Barbe, V., Barakat, M., Talla, E., Bonnefoy, V., Krin, E., Arsène-Pioletze, F. & other authors (2007). A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet* **3**, e53.
- Nejidat, A., Saadi, I. & Ronen, Z. (2008). Effect of flagella expression on adhesion of *Achromobacter piechaudii* to chalk surfaces. *J Appl Microbiol* **105**, 2009–2014.
- Oremland, R. S. & Stolz, J. F. (2003). The ecology of arsenic. *Science* **300**, 939–944.
- O’Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49–79.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285–293.
- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler, A. D. & Camilli, A. (2007). PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **282**, 12860–12870.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140–1154.
- Todhanakasem, T. & Young, G. M. (2008). Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol* **190**, 6030–6034.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S. & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* **182**, 6482–6489.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debekumari, B., Fauvert, M., Fransaer, J., Vermant, J. & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **16**, 496–506.
- Weeger, W., Lièvremont, D., Perret, M., Lagarde, F., Hubert, J. C., Leroy, M. & Lett, M. C. (1999). Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals* **12**, 141–149.
- Weiss, S., Carapito, C., Cleiss, J., Koechler, S., Turlin, E., Coppee, J. Y., Heymann, M., Kugler, V., Stauffert, M. & other authors (2009). Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite-oxidizing strain *Herminium monas arsenicoxydans* by proteomics data. *Biochimie* **91**, 192–203.

Edited by: J. G. Shaw



**Fig. S1-** TEM micrographs of *H. arsenicoxydans* **(a)**. wild-type strain **(b)**.  $\Delta fliL$  mutant cultivated in liquid medium. No flagellar difference was observed between the wild-type strain and the mutant.



**Fig. S2-** Two-dimensional view of the biofilm surface coverage after 24 hours of culture in the presence of 0.67 mM As(III) of **(a)**. the wild-type strain and **(b)**. the  $\Delta fliL$  mutant **(c)**. the  $\Delta aoxB$  mutant. In the presence of As(III), the surface colonization process began earlier in the two mutants than in the wild-type strain.

		<b>24 hours</b>	<b>48 hours</b>	<b>72 hours</b>
<b>WT</b>	0 mM As(III)	9.8 ± 2	3.5 ± 0.8	2.4 ± 0.5
	0.67 mM As(III)	0.5 ± 0.2	6.8 ± 4	2.1 ± 0.4
	0.67 mM As(V)	8.5 ± 3	1.5 ± 0.8	4.2 ± 0.7
<b><i>ΔfliL</i></b>	0 mM As(III)	8.5 ± 0.8	4.8 ± 2.5	3.4 ± 1.2
	0.67 mM As(III)	4.6 ± 1.7	5.2 ± 2.8	2.9 ± 1
<b><i>ΔaoxB</i></b>	0 mM As(III)	10.7 ± 0.4	1.8 ± 1.7	1.1 ± 0.7
	0.67 mM As(III)	5.1 ± 1.9	1.4 ± 0.9	1.2 ± 0.4

**Table S1-** Wild-type strain (WT) and *ΔfliL* and *ΔaoxB* mutants surface adhesion as a function of time in the absence and in the presence of arsenic. Results are expressed in percent of surface covered by cells.

	<b>Chloroform</b>		<b>Hexadecane</b>	
<i>As(III) concentration</i>	<i>0 mM</i>	<i>0.67 mM</i>	<i>0 mM</i>	<i>0.67 mM</i>
<b>WT</b>	77.8 ± 2.4	75.0 ± 3.4	3.4 ± 6.2	4.4 ± 4.1
<b><i>ΔfliL</i></b>	76.2 ± 4.0	77.1 ± 3.0	1.3 ± 4.1	1.3 ± 2.3
<b><i>ΔaoxB</i></b>	78.6 ± 0.3	78.5 ± 3.2	1.3 ± 1.9	3.3 ± 3.2

**Table S2-** Adhesion of the wild-type strain and the *ΔfliL* and *ΔaoxB* mutants cultivated in the presence or not of 0.67 mM arsenite to either chloroform or hexadecane. Results are expressed in percent of cells adhered to the solvent, a value of 100% indicating a total affinity of the cells for the tested solvent compared to water. Adhesion patterns of the three strains were not affected by the presence of arsenite and the three strains behavior did not differ significantly from each other ( $P>0.05$ ).

**C. Modification de la dynamique structurelle  
du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 en réponse  
à l'arsénite**

---

**I. Manuscrit**

**The biofilm structural dynamics in *Thiomonas* sp. in response to subinhibitory arsenite concentrations**

M. Marchal, R. Briandet, D. Halter, M. Erhardt, M. S. DuBow, M.-C. Lett, P. N. Bertin

En cours de préparation

**The biofilm structural dynamics in *Thiomonas* sp. in response to subinhibitory arsenite concentrations**

Marie Marchal<sup>1</sup>, Romain Briandet<sup>2</sup>, David Halter<sup>1</sup>, Mathieu Erhardt<sup>3</sup>, Michael S. DuBow<sup>4</sup>, Marie-Claire  
5 Lett<sup>1</sup>, Philippe N. Bertin<sup>1\*</sup>.

1 Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR7156 CNRS & Université de Strasbourg,  
Strasbourg, 67083, France, 2 INRA, UMR1319 MICALIS, Massy, 91300, France, 3 Institut de Biologie  
Moléculaire des Plantes du CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, 67084, France, 4 Université  
10 Paris-Sud 11, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Orsay, 91405, France.

\*To whom correspondence should be addressed. E-mail: [philippe.bertin@unistra.fr](mailto:philippe.bertin@unistra.fr)

**Running title:** Effect of arsenite on biofilm structural dynamics

15

**Subject category:** Microbial population and community ecology

## **Abstract**

Biofilms represent the most common microbial lifestyle, allowing the survival of microbial populations when exposed to harsh environmental conditions. Here, we show that the biofilm development of a bacterial species belonging to the genus *Thiomonas*, frequently found in arsenic polluted sites and playing a key role in arsenic natural bioremediation processes, is markedly modified when exposed to sub-lethal doses of this toxic element. Indeed, arsenite [As(III)] exposure led to considerable impacts on biofilm maturation by strongly increasing the extracellular matrix synthesis and by inducing significant cell death and lysis within microcolonies. In addition, small phage-like particles, possibly acting as gene transfer agents, appeared to be liberated during cell lysis. These processes were followed by the development of complex 3D-biofilm structures and subsequently the remobilisation of cells inside the previously formed hollow voids. Our results demonstrate that this biofilm community responds in a multimodal way to arsenite stress, enhancing its dispersal and also survival. Details about this complex bacterial adaptive response may be essential to understand how *Thiomonas* strains persist in these extreme environments. Similar mechanisms might be used by other microorganisms under adverse conditions.

**Keywords:** arsenic / biofilm / stress response / survival / *Thiomonas*

## Introduction

To cope with environmental stresses, microorganisms have evolved multiple survival strategies, including the synthesis of detoxification enzymes and the acquisition of resistance genes by horizontal transfer. These defence mechanisms may also rely on multicellular behaviours, such as those observed inside biofilms, where a part of the bacterial population can die to promote the survival of the remaining cells (Nadell *et al.*, 2009). Biofilms, which are surface-attached microbial communities embedded in an extracellular matrix, exhibit significantly higher survival capacities in extreme conditions compared to their planktonic counterparts (Davey and O'Toole G, 2000). They constitute the most common lifestyle for environmental microbial communities, providing them with several advantages. Indeed, the extracellular matrix provides the biofilm resident cells a physical barrier of protection against environmental stresses, including metal ions, and allows the development of a structured community with subsequent physiologic and genetic diversity (Lewis, 2008). To date however, little is known regarding the behaviour of environmental bacterial biofilms despite their roles in numerous processes: deleterious, e.g. biocorrosion and remobilisation of toxic elements, or beneficial, e.g. bioremediation (Flemming and Wingender, 2001b; Singh *et al.*, 2006). Due to the significance of these processes, it is of prime importance to understand and control them and this requires a better knowledge of the mechanisms governing biofilm formation and persistence.

Members of the genus *Thiomonas* are ubiquitous in extreme environments contaminated by arsenic (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006; Bruneel *et al.*, 2003), one of the most toxic elements currently known (Hughes, 2002). The acid mine drainage (AMD) waters of the former mine of Carnoulès, Gard (France), contain high arsenic levels (up to 4.66 mM) mainly in the form of arsenite As(III). Interestingly, this site is subjected to a natural process of remediation in which *Thiomonas* bacterial strains play a key role by oxidizing As(III) into As(V) which co-precipitates with iron and sulfur (Bruneel *et al.*, 2003). These Betaproteobacteria are also of particular interest for their use in bioremediation (Michel *et al.*, 2007). They have developed several resistance and adaptive

60 mechanisms to cope with arsenic stress, mainly by the means of detoxification enzymes. In addition, these strains have been shown to possess the ability to form biofilms (Arsene-Ploetze *et al.*, 2010; Bryan *et al.*, 2009). However, little is known regarding the underlying mechanism(s) and how this process may play a role in the persistence of strains in such extreme environments.

With this aim in view, we explored the effects of As(III) on biofilm formation and  
65 development of *Thiomonas* sp. CB2 isolated from the Carnoulès AMD waters, this strain being previously shown to form biofilms (Arsene-Ploetze *et al.*, 2010) and having the propensity to form flocs during planctonic growth (Marchal M., unpublished). In the present study, using multimodal confocal scanning, we show that the structural dynamics of the biofilm is markedly changed when bacteria are exposed to As(III). Importantly, our results highlight how this process may allow the  
70 strain to survive and also develop in such toxic ecosystems.

## Materials and methods

### Bacterial strain and culture media

*Thiomonas* sp. CB2, isolated from the acid mine drainage waters of Carnoulès, Gard (France) (Arsene-

75 Ploetze *et al.*, 2010), was cultivated on m126 (modified 126 medium) liquid medium as previously described (Bryan *et al.*, 2009). Arsenite [As(III)] was added at the desired concentration from sterile stocks of 667.4 mM of the metalloid ion in deionized water from NaAsO<sub>2</sub> salts (Prolabo, Fontenay-sous-bois, France).

### 80 Confocal Laser Scanning Microscopy

Cultures were performed in microscopic quality 35-mm polystyrene dishes (ibiTreat low 35-mm μ-Dish, Integrated BioDiagnostics, Martinsried, Germany) as follow: 1 mL of m126 medium, supplemented or not with As(III), was inoculated with 10 µL of an exponentially growing culture. Incubation was performed at 30°C under stagnant culture conditions. The medium was renewed

85 every day to avoid growth limitation due to nutrient depletion.

Before staining, samples were gently rinsed with 1 mL of 150 mM NaCl to remove loosely adherent planktonic cells. Cell viability was assessed by probing the cells for 15 min with 50 µL of a stock solution of SYTO9 (6 µM) and SYTOX Red (5 nM) (Molecular Probes, Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France) (Roth *et al.*, 1997). This combination was chosen for the spectral separation 90 of these dyes, as previously demonstrated for equivalent stains (Biggerstaff *et al.*, 2006). Polysaccharides within the exopolymeric matrix of the biofilm were stained with 50 µL of Alexa Fluor 633 conjugated to Concanavalin A (1 mg mL<sup>-1</sup>) (Molecular Probes, Invitrogen Corporation).

Z-stacks of horizontal plane images of biofilm were acquired with a step of 1 µm using multimodal confocal scanning laser microscopy (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems, Nanterre, 95 France) with a x63 (1.4 N.A.) oil immersion lens. Images were recorded at an excitation wavelength of 488 nm and 633 nm and emission wavelengths from 500 to 530 nm and from 657 to 757 nm for

SYTO9 and Alexa Fluor 633 conjugated to Concanavalin A, respectively. Simulated 3D fluorescence projections were generated using IMARIS 7.0.0 software (Bitplane, Zürich, Switzerland). Dead (SYTOX Red), total cell (SYTO9) and exopolysaccharide (ConA) volumes were quantified from images series 100 using PHLIP ([www.phlip.org](http://www.phlip.org)). For each experiment, six random microscope fields from two replicates were analyzed.

#### *Transmission electronic microscopy*

Transmission electronic microscopy was performed on 72h-old biofilm supernatants. 0.45 µm-filtered supernatants were deposited on formvar-coated nickel grids. They were examined at 50,000-fold magnification using a Hitachi H600 transmission electron microscope at 75kV acceleration voltage and photographed using a Hamamatsu *ORCA-HR* camera (*Hamamatsu* City, Shizuoka, Japan) with AMT software (Advanced Microscopy Techniques Corp., Danvers, Massachusetts, USA).

#### 110 *Statistical analysis*

The Student's two-tailed *t*-test was used to compare strain growth parameters and surface coverage. Significance was set at p-value <0.05 (*P*<0.05).

## Results

### 115      *Increased extracellular matrix synthesis under arsenite exposure*

To gain insight into the effects of arsenite on biofilm formation and development, the *Thiomonas* sp. CB2 strain was cultivated in microscopic quality 35-mm polystyrene dishes (Integrated BioDiagnostics) in the absence and presence of 1.33 and 2.67 mM As(III). The minimal inhibitory concentration for this strain has been previously determined to be 6 mM (Arsene-Ploetze *et al.*, 120 2010). In the range of concentrations tested here, arsenite does not significantly affect *Thiomonas* sp. CB2 planktonic growth (data not shown). To promote biofilm development, cultures were grown under stagnant conditions. Moreover, to avoid growth limitation due to nutrient depletion, the growth medium was renewed every day. The biofilm formation and development were investigated using multimodal confocal scanning. Potentially living cells were labelled with the cell permeable 125 nucleic acid fluorescent probe dye SYTO9, whereas cell mortality was visualized with a cell impermeable probe, i.e. SYTOX Red, an analogue of SYTOX Green (Molecular Probes, Invitrogen Corporation).

The bacterial adhesion began after about 24 hours of culture (data not shown). After 48 hours of growth cell adhesion was not significantly influenced by the presence of arsenite in the 130 culture media ( $P>0.05$ ), the percentage of bacterial surface coverage being of  $11.52 \pm 5.19$  in the absence of As(III) and of  $15.69 \pm 4.68$  and  $12.86 \pm 4.15$  (mean  $\pm$  SD) in the presence of 1.33 and 2.67 mM of As(III), respectively. Microcolonies were present in both the presence and absence of the metalloid, the most developed multicellular structures being filled with living cells, i.e. labelled with SYTO9 but not with SYTOX Red (data not shown).

135            To get further structural information about these bacterial cell aggregates, a fluorescently labelled lectin, Alexa Fluor 633 conjugated to Concanavalin A (Molecular Probes, Invitrogen Corporation), binding selectively  $\alpha$ -mannopyranosyl and  $\alpha$ -glucopyranosyl residues, was used to stain the polysaccharides present within the exopolymeric matrix of the biofilm. Interestingly, after 72

hours incubation, these microcolonies were surrounded by a higher amount of extracellular  
140 polysaccharides in the presence of arsenite, the exopolysaccharide volume, compared to the total  
cell volume, being 2.1 and 6.2-fold greater in the presence of 1.33 and 2.67 mM As(III), respectively,  
than with no As(III) (Figure 1). These data suggest that the exposure to the metalloid increased the  
extracellular polymer biosynthesis in *Thiomonas* sp. CB2.

145 *Sub-lethal arsenite concentrations led to localized cell death and lysis events accompanied by the  
liberation of phage-like particles*

When we examined the internal organization of the microcolonies within 72h-old biofilms,  
we observed that they were filled with dead cells only in the presence of arsenite. The proportion of  
dead cells increased with arsenite concentration, the dead cell volume, compared to the total cell  
150 volume, being 8.4 and 83.2-fold greater in the presence of 1.33 and 2.67 mM As(III), respectively,  
than with no As(III) (Figure 2). Following cell death, cell lysis events occurred inside arsenite exposed  
microcolonies, generating hollow voids (Figure 3a and 3b).

In addition to DNA and nutrient release, cell lysis events can result in the liberation of various  
cytoplasmic elements, including intracellular phage particles from induced prophages or  
155 pseudolysogens. We therefore examined culture supernatants from a 72h-old biofilm using  
Transmission Electronic Microscopy. Phage-like particles, possessing icosahedral symmetry and a  
diameter of  $29.26 \pm 1.73$  nm (mean  $\pm$  SD, n = 50), were also observed in arsenite-exposed biofilm  
supernatants (Figure 3c) and not detected in the absence of arsenite.

160 *Promotion of biofilm dispersal under arsenite exposure*

Concomitantly to cell lysis and phage-like particle release, the three-dimensional biofilm  
structures underwent complex rearrangements. This phenomenon began after 72 hours of culture  
(Figure 3a and 3b) and increased with time. Indeed, after 7 days of culture, we observed elaborated

sponge and coral-like biofilm structures, only in the presence of arsenite (Figure 4). These structures  
165 were covered by large amounts of exopolysaccharides and were up to 90 µm high.

Finally, when exploring these structures, we observed subpopulations of highly motile cells. These remobilized bacteria were present in at least 72h-old biofilms, inside the hollow biofilm voids generated by the cell lysis events (Figure 5 and supplementary data Movie S1). This subpopulation of cells may promote biofilm dispersal.

Bacteria of the genus *Thiomonas* are ubiquitously found in arsenic contaminated sites, including the AMD waters of the former mine of Carnoulès, Gard (France). We have recently shown that they are particularly well suited to survive in this extreme environment, combining several enzymatic defence mechanisms, such as arsenite metabolism and DNA repair systems. We have 175 hypothesized that these strains, in particular *Thiomonas* sp. CB2, are able to form protective biofilms in response to arsenite stress (Arsene-Ploetze *et al.*, 2010). In the present study, comparing *Thiomonas* sp. CB2 biofilm formation in the absence and presence of arsenite at sub-lethal concentrations, we observed that this strain increased its exopolysaccharide production in the presence of arsenite. The extracellular matrix of a biofilm limiting the diffusion of charged toxic 180 compounds (Harrison *et al.*, 2007), this observation supports our hypothesis that biofilm formation is part of the arsenite defence mechanism in this strain.

However, the effect of arsenite on biofilm formation was not restricted to exopolysaccharide synthesis. Indeed, we observed that the overall biofilm development was strongly modified in response to arsenite, starting with localized cell death and lysis events. Such events have previously 185 been described in other strains and several hypotheses have been proposed, including one based on the coexistence of subpopulations of cells differing in their physiological state (Bayles, 2007; Pamp *et al.*, 2008). In the case of *Thiomonas* sp. CB2, a similar mechanism may explain the cell death events we observed inside the microcolonies of the arsenite-exposed biofilms. Indeed, arsenite stress can lead to change in DNA and proteins, and thus arsenic-tolerance may require more active cell 190 physiology, i.e. the extensive synthesis of detoxification enzymes, efflux pumps, and DNA repair systems (Stolz *et al.*, 2006). The cells located in the centre of the microcolonies, known to exhibit low metabolic activity (Stewart and Franklin, 2008), may also be more susceptible to this stress.

Localized cell death and lysis events are thought to contribute to the increased antibacterial compound tolerance of biofilm cells, the lysis of a subpopulation of cells providing among others 195 nutrients and cellular polymers to protect the remaining cells (Bayles, 2007; Lopez *et al.*, 2009).

These events may also enhance the survival of the biofilm population under arsenite exposure. Moreover, they appear to be of prime importance in the subsequent developmental processes we observed in the presence of arsenite. Indeed, cell lysis resulted in the liberation of phage-like particles. These particles may play a role in the previous cell death events, possibly in a manner 200 analogous to that of a filamentous bacteriophage implicated in biofilm cell killing in *Pseudomonas aeruginosa* (Rice *et al.*, 2009; Webb *et al.*, 2003). Their liberation may also act as a species survival mechanism, leading to increased horizontal gene transfer and enhancing the genetic diversity of the remaining population. Their exact nature and roles are currently under investigation.

The cell death and lysis events were also the starting point of the biofilm three-dimensional 205 development. The remarkable complex biofilm structures we observed in the presence of sub-lethal arsenite concentrations may be the result of the high quantities of exopolysaccharide present, playing a key role in biofilm cohesion (Flemming and Wingender, 2001a). Our results also suggest that the increased exopolysaccharide presence observed in the presence of arsenite at the beginning 210 of the biofilm development process reinforces the biofilm integrity. DNA from lysed cells may also affect the biofilm architecture, extracellular DNA being shown to be an important component of the biofilm matrix (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Whitchurch *et al.*, 2002). These elaborated microbial organizations increased the biofilm heterogeneity and may also favour the development of distinct subpopulations of cells (Stewart and Franklin, 2008). This hypothesis is supported by the presence of highly motile subpopulations inside the biofilm hollow voids (Figure 5 and supplementary data Movie 215 S1). This biofilm dispersal promoting phenomenon (Mai-Prochnow *et al.*, 2006) may also allow the strain to colonize more favourable environments.

A high phenotypic or genetic diversity is essential for the survival of a population (Boles and Singh, 2008; Boles *et al.*, 2004). In this respect, in *Thiomonas* sp. CB2 biofilms, the diversity of the population in the presence of arsenite may be promoted by an increased structural heterogeneity 220 but also by the phage-like particles. Using comparative genomic analysis, we have previously shown that the strains of the genus *Thiomonas*, isolated from the Carnoulès AMD waters, exhibit a high

genetic diversity (Arsene-Ploetze *et al.*, 2010). Indeed, their genome presents numerous genomic islands, i.e. variable genomic regions, suggesting important genome plasticity and frequent genomic rearrangements. This genomic diversity may be promoted, at least in part, inside biofilms through  
225 the here-described arsenic-induced mechanisms.

In conclusion, our results suggest that, in *Thiomonas* sp. CB2, the formation of a biofilm plays several roles in the arsenite resistance process. First of all, an increased exopolysaccharide production confers a physical protection to the biofilm resident cells. Moreover, the overall  
230 *Thiomonas* sp. CB2 biofilm development is markedly modified in response to sub-lethal arsenite concentrations leading to the generation of diverse biofilm subpopulations and promoting the dispersal of part of the community. It is tempting to speculate that the survival of this strain in its extreme environment relies on a rapid diversity production followed by biofilm dispersal. These processes may confer an important selective advantage by allowing the strain to survive in harsh  
235 conditions and also to colonize more favourable environments. Moreover, our observations suggest that *Thiomonas* sp. CB2 may be persistent in the Carnoulès AMD waters and also that it will assure a long-term role in the natural bioremediation process occurring in this site. More importantly, our results suggest that these biofilm-associated processes constitute an adaptive strategy widely conserved among bacteria in response to various adverse conditions.

The authors would like to thank Dr Odile Bruneel for providing the *Thiomonas* sp. CB2 strain and Julien Deschamps for processing the confocal data. Transmission electron microscopy was performed at the Strasbourg Esplanade Cellular Imaging Facility (Strasbourg, France) and confocal laser scanning

245 microscopy was performed at the Microscopy and Imaging Platform (MIMA2, INRA, Massy, France).

MM was supported by a studentship from the ANR COBIAS project (PRECODD 2007, Agence Nationale de la Recherche). This work was performed as part of the program of the « Groupement de Recherche - Métabolisme de l'Arsenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS) » (<http://gdr2909.u-strasbg.fr>).

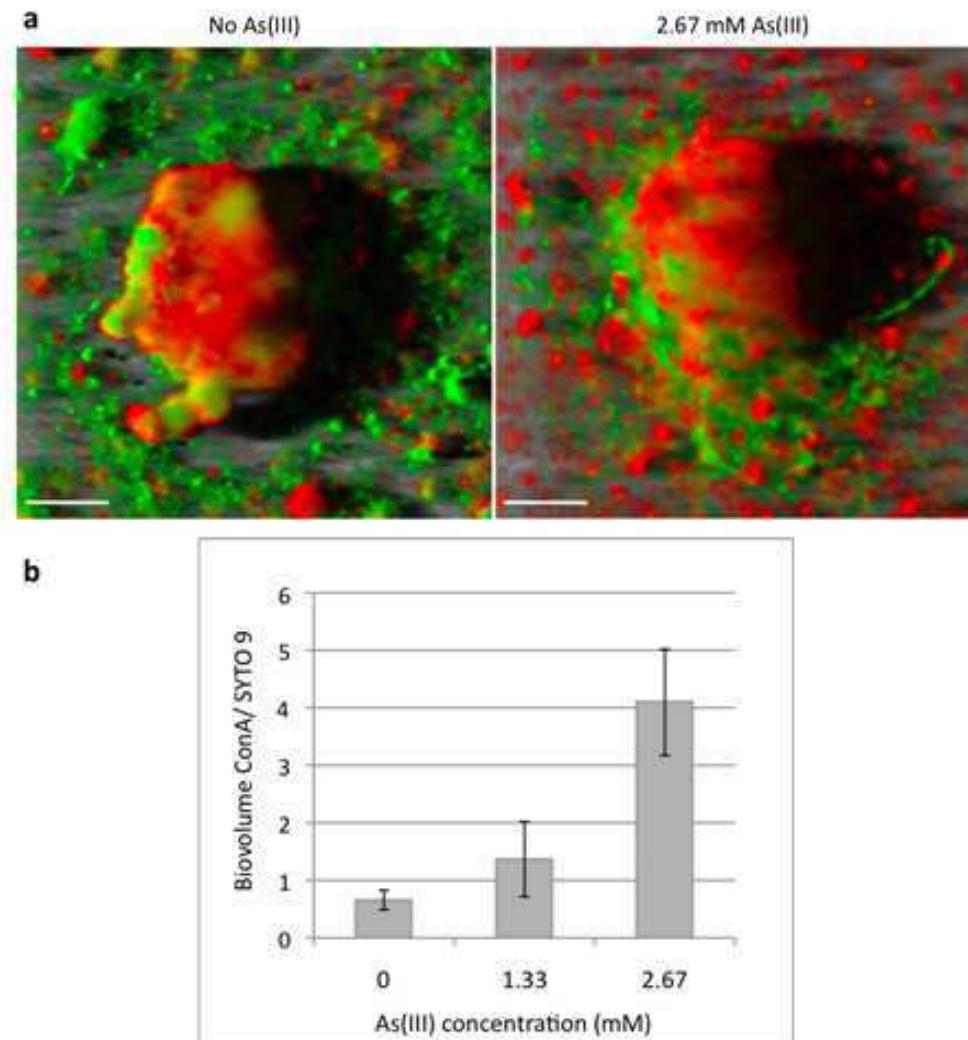
**Supplementary information is available at *The ISME Journal's* website.**

## References

- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S *et al* (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**: 1114-28.
- Arsene-Pioletze F, Koechler S, Marchal M, Coppee JY, Chandler M, Bonnefoy V *et al* (2010). Structure, Function, and Evolution of the *Thiomonas* spp. Genome. *PLoS Genet* **6**: e1000859.
- Battaglia-Brunet F, Joulian C, Garrido F, Dictor MC, Morin D, Coupland K *et al* (2006). Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 99-108.
- Bayles KW (2007). The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **5**: 721-6.
- Biggerstaff JP, Le Pui M, Weidow BL, Prater J, Glass K, Radosevich M *et al* (2006). New methodology for viability testing in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes* **20**: 141-146.
- Boles BR, Singh PK (2008). Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12503-8.
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2004). Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16630-5.
- Bruneel O, Personne JC, Casiot C, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, Mahler BJ *et al* (2003). Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J Appl Microbiol* **95**: 492-9.
- Bryan CG, Marchal M, Battaglia-Brunet F, Kugler V, Lemaitre-Guillier C, Lièvremont D *et al* (2009). Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiol* **9**: 127.
- Davey ME, O'Toole G A (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847-67.
- Flemming HC, Wingender J (2001a). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* **43**: 1-8.
- Flemming HC, Wingender J (2001b). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* **43**: 9-16.
- Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**: 928-38.
- Hughes MF (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* **133**: 1-16.
- Lewis K (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 107-31.
- Lopez D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2009). Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **74**: 609-18.

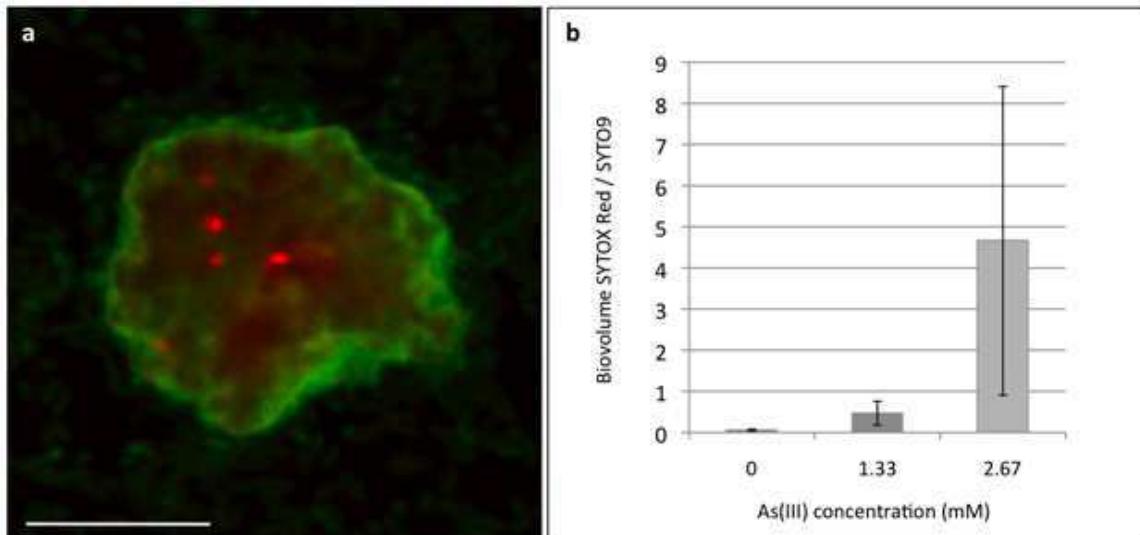
- 305 Mai-Prochnow A, Webb JS, Ferrari BC, Kjelleberg S (2006). Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5414-20.
- 310 Michel C, Jean M, Coulon S, Dictor MC, Delorme F, Morin D *et al* (2007). Biofilms of As(III)-oxidising bacteria: formation and activity studies for bioremediation process development. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 457-67.
- Nadell CD, Xavier JB, Foster KR (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 206-24.
- 315 Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T (2008). Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol* **68**: 223-40.
- Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M *et al* (2009). The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J* **3**: 271-82.
- 320 Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2421-31.
- 325 Singh R, Paul D, Jain RK (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol* **14**: 389-97.
- Stewart PS, Franklin MJ (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**: 199-210.
- 330 Stoltz JF, Basu P, Santini JM, Oremland RS (2006). Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol* **60**: 107-30.
- Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B *et al* (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**: 4585-92.
- 335 Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.

## Figures



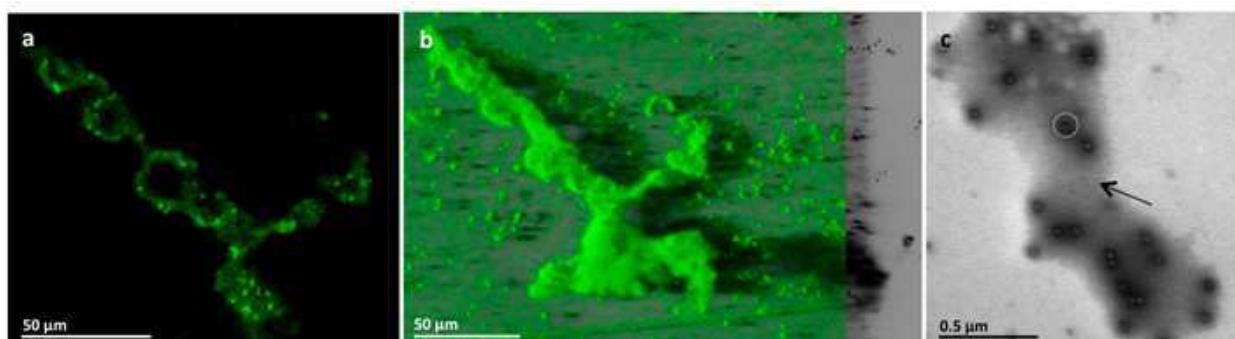
**Figure 1**

As(III)-induced exopolysaccharide biosynthesis. 72h-old *Thiomonas* sp. CB2 biofilms were stained using SYTO9 (cells, green) and a labeled lectin, ConA (exopolysaccharides, red). **a.** Three-dimensional confocal reconstruction of representative microcolonies using IMARIS software in the absence and presence of 2.67 mM As(III). **b.** Biovolume ConA/ SYTO9 as a function of As(III) concentration. Cells (SYTO9) and exopolysaccharide (ConA) volumes were quantified with light emission intensity using PHLIP software ([www.phlip.org](http://www.phlip.org)). For each experiment, six random microscope fields from two replicates were analyzed. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .



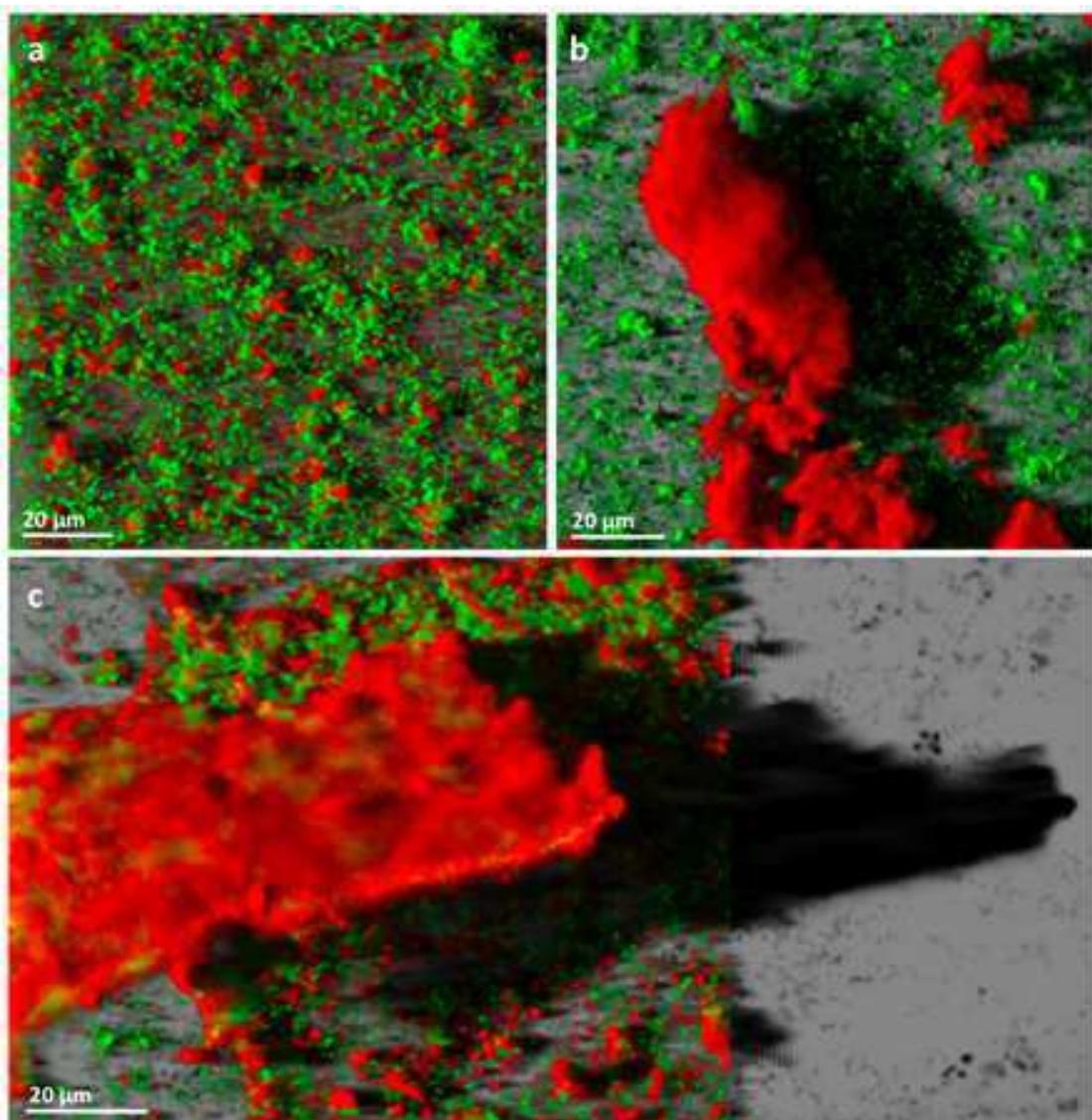
**Figure 2**

Cell death in microcolonies of 72h-old *Thiomonas* sp. CB2 biofilms under As(III) exposure. **a.** Cell death occurs in localized regions in microcolonies. Confocal micrograph of a 1.33 mM As(III)-exposed biofilm microcolony visualised using viability stains. **b.** Biovolume SYTOX Red/SYTO9 as a function of As(III) concentration. Dead (SYTOX Red) and total cell (SYTO9) volumes were quantified using light emission intensity with PHLIP software. For each experiment, six random microscope fields from two replicates were analyzed. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$



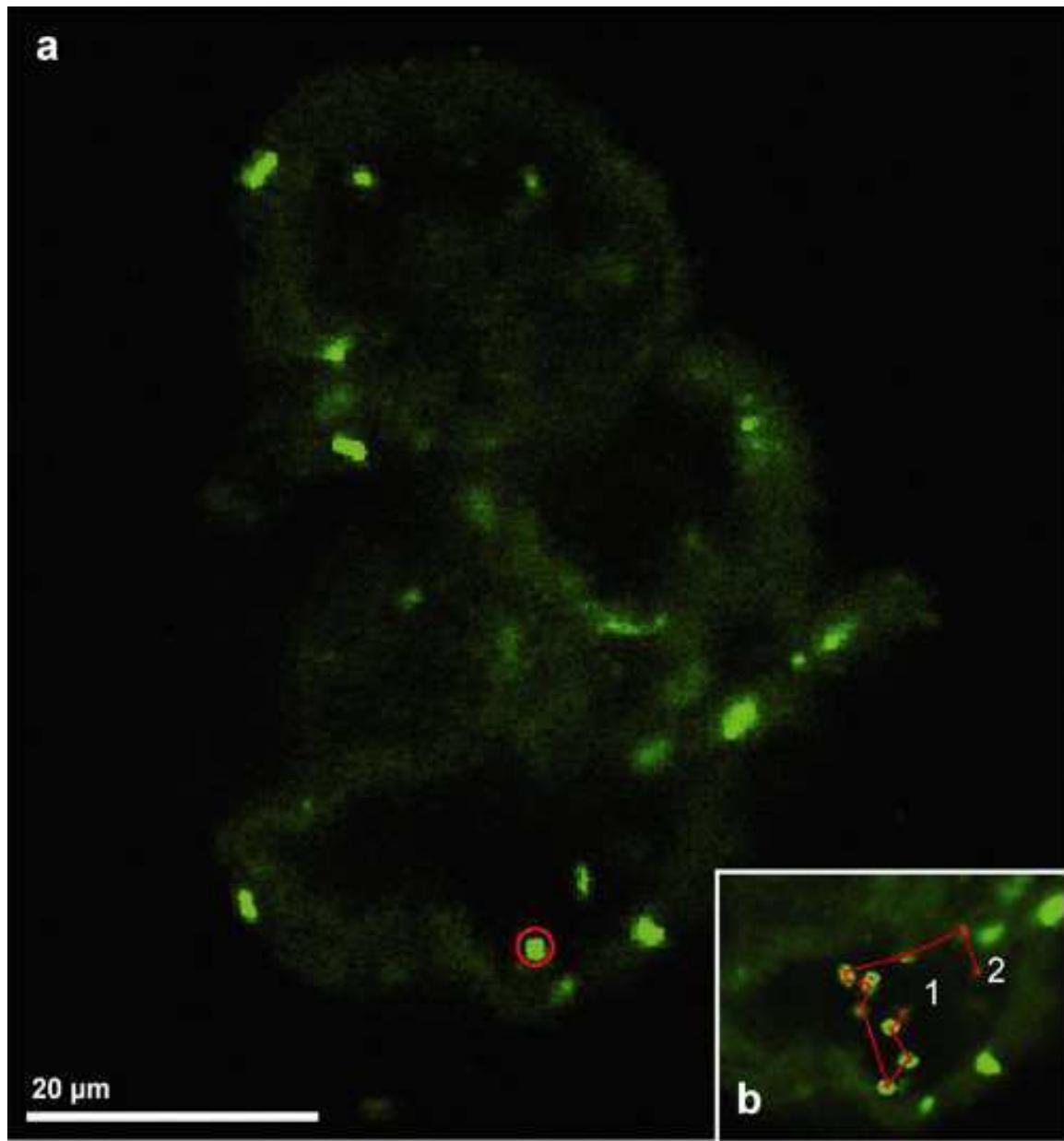
**Figure 3**

Cell lysis inside microcolonies and liberation of phage-like particles in the presence of As(III). 2D-confocal micrograph (**a**) and 3D-confocal reconstruction using IMARIS software (**b**) of a 72h-old 2.67 mM As(III)-exposed biofilm structure. Cells were stained with SYTO9. Hollow voids appeared inside microcolonies subsequent to cell lysis. **c.** Transmission electronic micrograph of a 72h-old 1.33 mM As(III)-exposed biofilm supernatant. 0.45  $\mu\text{m}$ -filtered supernatants obtained from 72h-old biofilms were deposited on a formvar-coated nickel grid and examined using a Hitachi 600 transmission electron microscope at 75kV accelerating voltage and photographed using a Hamamatsu ORCA-HR camera with AMT software. Phage-like particles (circle) with an icosahedral symmetry and a diameter of  $29.3 \pm 1.7$  nm (mean  $\pm$  SD, n = 50) were observed only in culture supernatants obtained from As(III)-exposed biofilms. These particles are embedded in an exopolysaccharide-like matrix (arrow). A mean of  $21.8 \pm 16$  particles (mean  $\pm$  SD, n = 16) were observed in each microscope field at a direct magnification of 50000.



**Figure 4**

Three-dimensional confocal reconstruction of 7 day-old *Thiomonas* sp. CB2 biofilms cultivated in the absence (a) or in the presence of 1.33 mM (b) and 2.67 mM As(III) (c). Biofilms were stained using SYTO9 (cells, green) and ConA (exopolysaccharide, red). Arsenic exposure induced altered biofilm architecture, leading to the formation of sponge- (b) and coral-like structures (c).



**Figure 5**

Motile bacteria swimming inside hollow voids. **a.** 2D-confocal representation of hollow voids of a 72h-old 2.67 mM As(III)-exposed biofilm structure containing swimming bacteria. Cells were stained with SYTO9. **b.** 2D-time progression, in red, from point 1 to point 2 of the cell circled on panel (a). The representation is a projection of 16 confocal images taken at 1.63 second intervals.

## II. Matériel et méthodes supplémentaires : étude des particules de type phagique

Lors des événements de mort et lyse cellulaires localisés au centre des microcolonies du biofilm exposé à l'As(III), des particules présentant une symétrie icosaédrique et un diamètre de 30 nm sont libérées dans le milieu extérieur. Afin d'identifier leur nature et rôle, une analyse de leur contenu protéique et en acides nucléiques a été réalisée.

### 1. Récupération des particules de type phagique

La culture de *Thiomonas* sp. CB2 a été réalisée en microplaqué 6 trous. Par trou, 7.2 mL de milieu m126 (Bryan *et al.*, 2009) contenant ou non 1.33 mM d'As(III) ont été ensemencés avec 0.8 mL de préculture en phase exponentielle de croissance. La culture a été incubée à 30°C, en conditions statiques, avec renouvellement quotidien du milieu, comme décrit dans le manuscrit ci-dessus. Le biofilm et le surnageant de culture ont été récupérés après 72 h d'incubation et digérés 24 h à 55°C par 2 µg mL<sup>-1</sup> de Glucanase 2 (Lucigen) puis 2 h à 37°C par 5 U mL<sup>-1</sup> de Benzonase Nuclease (Sigma-Aldrich). Le biofilm digéré a ensuite été centrifugé 10 min à 5 000 g et le surnageant obtenu a été filtré à 0.2 µm. Le volume du surnageant contenant les particules de type phagique a été concentré 200 fois par centrifugation à 2 000 g pendant 30 min sur une colonne Vivaspin 20 (Sartorius) présentant un « cutoff » de 100 000 Da.

### 2. Analyse des protéines extracellulaires contenues dans le biofilm

Les protéines contenues dans 100 µL de surnageant concentré obtenu selon le protocole décrit ci-dessus ont été précipitées une nuit à -20°C dans un volume d'une solution d'acide trichloroacétique/acétone 15%. Le culot récupéré après centrifugation à 13 000 g pendant 30 min a été lavé deux fois à l'éthanol à 100% et une fois à l'éthanol à

## Chapitre 2. Effets de l'arsenic sur la cinétique de développement de biofilms

### C. Modification de la dynamique structurelle du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 en réponse à l'arsénite

---

70%, puis resuspendu dans 50 µL de tampon (Tris-HCl 31.25 mM pH 6.8, glycérol 5%, SDS 1%, β-mercaptopéthanol 2.5%, bleu de bromophénol 0.31%). Après chauffage à 100°C pendant 1 min, la suspension de protéines a été déposée sur gel SDS-PAGE 12% puis soumise à électrophorèse (100 V, 1 h, système Mini-PROTEAN®3 Cell (BioRad)). Le gel obtenu a été coloré au bleu de Coomassie colloïdal.

Les étapes suivantes ont été réalisées au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (A. Van Dorsselaer). Le gel a été découpé de manière systématique et les bandes obtenues ont été digérées à la trypsine par un système de digestion protéique automatique (MassPREP Station, Waters). Les bandes ont été lavées 3 fois avec une solution contenant 1 volume de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (25 mM) et 1 volume d'acétonitrile. Les résidus cystéiques ont été réduits avec du dithiothreitol pendant 30 min à 57°C puis traités avec de l'iodoacétamide à température ambiante pendant 20 min. Après déshydratation par de l'acétonitrile, les protéines ont été digérées dans le gel par 20 µL de trypsine de porc à 12.5 ng µL<sup>-1</sup> (Promega) dans 25 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pendant une nuit à 37°C. Une double extraction a ensuite été réalisée, dans un premier temps par ajout d'acétonitrile à 60% dans 5% d'acide formique, puis avec de l'acétonitrile à 100%. Les peptides trypsiques obtenus ont été analysés par nanoLC-MS/MS sur un système Agilent 1100 series HPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies) couplé à un HCT Plus ion trap (Bruker Daltonics) comme précédemment décrit (Buhr *et al.*, 2007). Les données MS/MS ont été obtenues grâce à un serveur local Mascot (MASCOT 2.2.0, MatrixScience) et la banque de données NCBI nr (effectué en mars 2010, 10551781 séquences disponibles). Les recherches ont été effectuées avec une tolérance de masse de 0.2 Da en modes MS et MS/MS et avec les paramètres suivants : spécificité totale pour la trypsine avec un site de coupure manqué autorisé, carbamidométhylation des résidus cystéines, oxydation des résidus méthionines et acétylation des acides aminés terminaux en modifications variables. Aucune restriction taxonomique n'a été effectuée.

### **3. Extraction des acides nucléiques des particules de type phagique**

Les particules de type phagique (contenues dans le surnageant concentré obtenu selon le protocole décrit ci-dessus) ont été lysées à 55°C pendant 1 h dans un volume d'une solution ajustée à pH 8 contenant 1% de sodium dodécyl sulfate, 2 M de guanidium thiocyanate et 1 mM de Tris-HCl. Les acides nucléiques ont ensuite été séparés de la fraction protéique par ajout d'un volume d'Aquaphénol à pH 8 (MP Biomedicals) et d'un volume de chloroforme/isoamyl alcool (MP Biomedicals), incubation à 65°C pendant 5 min, centrifugation à 13 000 g pendant 5 min et récupération de la phase supérieure obtenue. Un deuxième rinçage de la phase supérieure obtenue a été effectué par ajout d'un volume de chloroforme et centrifugation à 13 000 g pendant 5 min. Les acides nucléiques ont ensuite été précipités pendant une nuit à -20°C par ajout d'1/10<sup>e</sup> de volume d'une solution d'acétate de sodium 3 M à pH 5.2, de 2 volumes d'éthanol absolu et 1 µL de glycogène. Le culot d'acides nucléiques a été récupéré par une centrifugation à 13 000 g, à 4°C, pendant 20 min, lavé avec de l'éthanol à 70% puis resuspendu dans de l'eau milli-Q.

Afin d'identifier leur nature, 400 ng des acides nucléiques obtenus ont été digérés pendant 1 h à 37°C par 10 U de DNase 1 (Amersham), 1 µL de RNase Mix (Invitrogen) ou 100 U de Nucléase S1 (Euromedex). La taille des acides nucléiques obtenus a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%.

## **III. Résultats complémentaires**

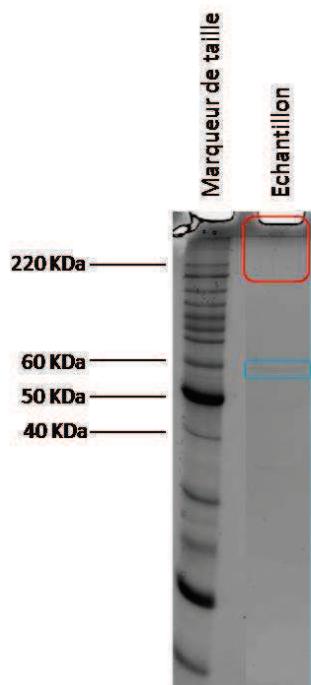
Le biofilm âgé de 72 h exposé à l'As(III) et contenant les particules de type phagique a été digéré par traitement à la glucanase (élimination des sucres) et à la benzonase (digestion des acides nucléiques). Les particules ont été concentrées sur une colonne présentant un « cutoff » de 100 kDa après élimination des cellules par filtration. Ce « cutoff » permet de

## Chapitre 2. Effets de l'arsenic sur la cinétique de développement de biofilms

### C. Modification de la dynamique structurelle du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 en réponse à l'arsénite

récupérer dans un volume 500 fois plus faible les particules (et protéines) dont le poids moléculaire est supérieur à 100 kDa et/ou le diamètre supérieur à 20 nm.

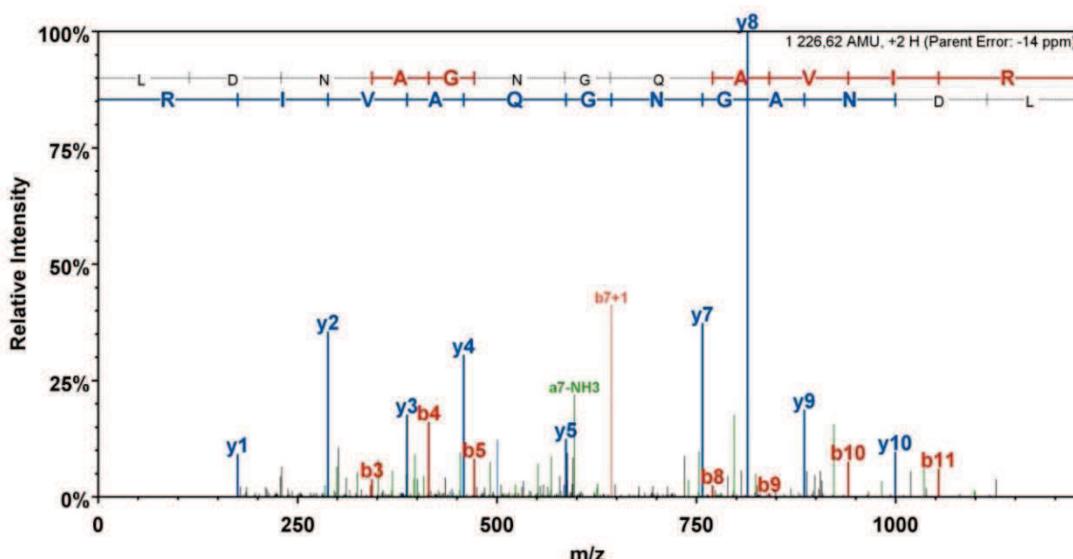
La solution concentrée a été déposée sur un gel d'acrylamide à une dimension. En analysant par nanoLC-MS/MS les protéines présentes dans le gel, un peptide présentant une homologie de séquence avec une protéine d'origine phagique de liaison à l'ADN simple brin (gp32, origine : phage T4, numéro d'accésion NCBI : gi|116326457) a été retrouvé deux fois, au niveau du puits de dépôt et dans la bande de 2 mm située juste en-dessous du puits (Figures 18 et 19). La localisation sur le gel de cette protéine d'une taille théorique de 32 kDa semble indiquer qu'elle n'a pas été dénaturée lors du traitement. Les protéines présentant une homologie de séquence avec les peptides retrouvés dans le gel sont présentées dans le tableau 3.



**Figure 18.** Gel SDS-PAGE 12% sur lequel a été déposé le surnageant concentré d'un biofilm âgé de 72 h exposé à l'As(III). En rouge sont entourées les bandes du gel dans lesquelles a été retrouvé le peptide présentant une homologie de séquence avec la protéine de phage. La bande entourée en bleu contient la glucanase utilisée pour la digestion du biofilm. Le marqueur de taille utilisé est le BenchMark<sup>TM</sup> Protein Ladder (Invitrogen).

## Chapitre 2. Effets de l'arsenic sur la cinétique de développement de biofilms

### C. Modification de la dynamique structurelle du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 en réponse à l'arsénite



**Figure 19.** Spectre MS/MS du peptide retrouvé au niveau du puits de dépôt et matchant avec la protéine gp32 de l'*Enterobacteria* phage RB3.

Numéro d'accession (NCBI)	Protéines identifiées et organisme affilié	Poids moléculaire	Nombre de peptides retrouvés dans le gel
gi 10120659	Thioredoxin réductase [ <i>Escherichia coli</i> ]	12 kDa	33
gi 220935138	Protéine flagellaire FliF M-ring [ <i>Thioalkalivibrio</i> sp. HL-EbGR7]	60 kDa	3
gi 110807031	ATP-dependent ARN hélicase [ <i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401]	73 kDa	9
gi 256758655	Protéine chaperone GroEL [ <i>Thiomonas intermedia</i> K12]	?	12
gi 257470756	Répresseur de transcription hrcA [ <i>Fusobacterium ulcerans</i> ATCC 49185]	?	1
gi 256760375	Domaine de la flagelline [ <i>Thiomonas intermedia</i> K12].	?	4
gi 256760489	Glutamine synthétase, type I [ <i>Thiomonas intermedia</i> K12].	?	3
gi 256759719	Porine de type Gram-négative [ <i>Thiomonas intermedia</i> K12].	?	1
gi 116326457	Protéine de liaison à l'ADN simple brin [ <i>Enterobacteria</i> phage RB32]	34 kDa	3

**Tableau 3.** Liste des protéines pour lesquelles un ou plusieurs peptides ont été retrouvés dans le gel SDS-PAGE 12% sur lequel a été déposé le surnageant d'un biofilm âgé de 72h et exposé à l'As(III).

En parallèle à l'analyse des protéines, les acides nucléiques présents dans les particules de type phagique ont été extraits. Pour dissocier les acides nucléiques des protéines, le surnageant concentré contenant les particules (précédemment traité à la

## Chapitre 2. Effets de l'arsenic sur la cinétique de développement de biofilms

### C. Modification de la dynamique structurelle du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 en réponse à l'arsénite

benzonase pour supprimer tous les acides nucléiques ne se trouvant pas dans les particules) a été traité avec un volume de solution de lyse protéique contenant du sodium dodécyl sulfate et du guanidium thiocyanate. Les acides nucléiques ont ensuite été séparés des protéines par une méthode d'extraction au phénol/chloroforme. Par cette méthode, 5 à 10 fois plus d'acides nucléiques ont été extraits du biofilm exposé à l'As(III) par rapport à celui non exposé. En électrophorèse sur gel d'agarose, la taille apparente de ces acides nucléiques est d'environ 50 pb (Figure 20). Alors qu'une RNase n'a pas d'effet sur ces acides nucléiques, ils sont partiellement dégradés par une DNase et totalement par une Nucléase S1 (dégradant spécifiquement les ADN simple brin), ce qui indique que ces fragments sont des ADN simple brin (Figure 20). Par conséquent, leur taille réelle n'est pas encore définie, des interactions intramoléculaires pouvant affecter la taille apparente du fragment d'ADN.



**Figure 20.** Migration sur gel d'agarose 2% des acides nucléiques extraits des particules de type phagique, non digérés (piste 1), digérés avec de la DNase 1 (2), de la RNase (3) et de la Nucléase S1 (4). Le marqueur de taille (MT) utilisé est le 1Kb DNA Ladder (Biolabs).

## **D. Discussion et conclusion**

---

La structure et l'évolution des biofilms sont souvent modifiées en réponse à des agents bactéricides. Ces changements permettent entre autres la mise en place de mécanismes adaptatifs. Les résultats des deux études présentées dans ce chapitre soulignent le fait que l'As(III), en concentrations subinhibitrices, modifie différemment la cinétique de développement des biofilms selon les souches. Toutefois, chez les deux souches bactériennes testées, la présence d'As(III) affecte des fonctions clés de la formation des biofilms : la mobilité et la synthèse d'exopolysaccharides. Les résultats des deux études sont discutés ci-dessous.

### **I. Impact de l'As(III) sur les fonctions clés de la formation du biofilm *d'Herminiimonas arsenicoxydans***

*Herminiimonas arsenicoxydans* est une souche vivant préférentiellement à l'état planctonique en conditions de culture classiques. Lors de l'étude présentée dans ce chapitre, il a été montré qu'en conditions de culture statiques la souche est capable de former un biofilm dont la cinétique de développement (attachement des cellules, maturation du biofilm et détachement des cellules) est de 72 heures. Alors qu'il avait été précédemment décrit qu'en présence d'As(III) les cellules planctoniques synthétisent une plus forte quantité de polysaccharides extracellulaires (Muller *et al.*, 2007), aucune modification de structure du biofilm n'a été observée ici en présence d'As(III). Cette observation pourrait être expliquée par le fait que la souche serait capable de synthétiser deux types de polysaccharides extracellulaires en fonction des conditions de culture, des polysaccharides de capsule – fortement liés à la cellule – et des exopolysaccharides – libérés dans le milieu extérieur et impliqués dans la structure du biofilm –. Cette hypothèse est soutenue par des études

génétiques montrant qu'*H. arsenicoxydans* possède à la fois un opéron potentiellement impliqué dans la synthèse de polysaccharides de capsule (Tableau 4) et un autre potentiellement impliqué dans la synthèse d'exopolysaccharides (Tableau 5). La synthèse des exopolysaccharides ne serait pas induite par l'As(III) en conditions de culture statiques contrairement aux polysaccharides de capsule. Afin de valider cette hypothèse, une étude de la composition des polysaccharides extracellulaires pourrait être réalisée ainsi qu'une mesure du niveau d'expression des gènes clés par q-RT-PCR (quantitative Reverse Transcription-PCR) dans les différentes conditions de culture.

Gène	Fonction putative
<b>HEAR1142</b>	Protéine membranaire
<b>HEAR1143</b>	Protéine hypothétique conservée
<b>HEAR1144</b>	Glycosyl transférase
<b>HEAR1145</b>	Glycosyl transférase
<b>HEAR1146</b>	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
<b>HEAR1147</b>	Protéine de biosynthèse des polysaccharides CapE-like
<b>HEAR1148</b>	Enzyme de biosynthèse des polysaccharides de capsule Cap5G
<b>HEAR1149</b>	UDP-glucose 4-epimerase CapN-like
<b>HEAR1150</b>	Enzyme de biosynthèse des polysaccharides de capsule CapM-like
<b>HEAR1151</b>	Protéine de biosynthèse des polysaccharides CapD
<b>HEAR1152</b>	dTDP-glucose 4,6 dehydratase
<b>HEAR1153</b>	Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase
<b>HEAR1154</b>	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-épimérase
<b>HEAR1155</b>	dTDP-4-dehydrorhamnose réductase

**Tableau 4.** Structure opéronique contenant des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de polysaccharides de capsule, i.e. codant pour des enzymes de biosynthèse des sucres, dont des glycosyl transférases, et des protéines de la membrane externe.

Gène	Fonction putative
HEAR0712	Protéine hypothétique conservée
HEAR0713	Glycosyltransférase de biosynthèse des polysaccharides
HEAR0714	Protéine impliquée dans l'export des polysaccharides
HEAR0715	Protéine de biosynthèse des exopolysaccharides EpsF-like
HEAR0716	Tyrosine kinase EpsG-like
HEAR0717	Protéine de polymérisation des exopolysaccharides PssK-like
HEAR0718	Glycosyl transférase
HEAR0719	Protéine de biosynthèse des exopolysaccharides EpsM-like
HEAR0720	Acyltransférase
HEAR0721	Protéine hypothétique
HEAR0722	O-acetyltransférase
HEAR0723	Glycosyl transférase
HEAR0724	Glycosyl transférase
HEAR0725	N-acetylglucosaminyldiphosphoundecaprenol N-acetyl-beta-D-mannosaminyltransferase
HEAR0726	UDP-glucose 4-épimérase
HEAR0727	Mannose-1-phosphate guanyltransférase
HEAR0728	Mannose-1-phosphate guanyltransférase
HEAR0729	Protéine hypothétique conservée
HEAR0730	Protéine de biosynthèse des polysaccharides

**Tableau 5.** Structure opéronique contenant des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse des exopolysaccharides, i.e. codant pour des enzymes de biosynthèse des sucres dont les glycosyl transférases et des protéines d'export des polysaccharides.

La présence d'As(III) retarde l'étape initiale de la formation du biofilm, c'est-à-dire l'adhésion des cellules, stade où les cellules passent d'un état planctonique à un état sessile. Ce retard n'a toutefois pas été observé chez des mutants non mobiles ou déficients au niveau de leur activité arsénite-oxydase. Cette observation peut être aisément expliquée pour les mutants atteints au niveau de la mobilité car mobilité et adhésion sont des processus mutuellement exclusifs. Dans le cas des mutants déficients au niveau de leur activité arsénite oxydase, le retard dans les processus d'adhésion peut être expliqué de manière similaire. En effet, alors que la souche sauvage présente une induction de la mobilité en présence d'As(III), les mutants « aox » ne présente plus ce phénotype (Koechler *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2007). Il semblerait que la souche récupère l'énergie de l'oxydation de l'As(III) en As(V), ce qui se traduit par une augmentation de la mobilité flagellaire. En conditions de culture favorisant la formation d'un biofilm, la présence d'As(III), et plus particulièrement l'activité arsénite-oxydase, induirait la mobilité des cellules retardant ainsi

l'initiation du biofilm. Le lien exact existant entre l'activité arsénite-oxydase et la mobilité flagellaire reste cependant inconnu. Ce lien a été observé chez d'autres souches arsénite-oxydantes, dont une agrobactérie, *Rhizobium* sp. NT-26 qui est mobile uniquement en présence d'As(III) (Santini *et al.*, 2000). Ce phénotype très marqué facilite l'identification des mécanismes de régulation de la mobilité flagellaire en réponse à l'As(III). Une approche de mutagenèse aléatoire et des puces à ADN sont actuellement en cours pour identifier dans cette souche les différents acteurs de ce procédé.

## II. Dynamique structurelle du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 en présence d'As(III)

*Thiomonas* sp. CB2 est la souche du genre *Thiomonas* formant les biofilms les plus importants (voir **Chapitre 1. Physiologie et génomique de souches du genre *Thiomonas***). Lors de l'étude réalisée dans le cadre de ce travail de thèse, il a été mis en évidence que la présence d'As(III) entraîne une modification très importante de la dynamique structurelle du biofilm qu'elle forme.

En absence d'As(III), le biofilm mature est constitué de structures de type « champignon » s'apparentant à celles d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Klausen *et al.*, 2003). Durant les sept jours qu'a duré l'étude, aucune dispersion des cellules n'a été observée. La présence d'As(III), en conditions subinhibitrices, modifie fortement l'étape de maturation du biofilm. Dans un premier temps, l'As(III) induit la synthèse d'exopolysaccharides, ces derniers assurant la cohésion et le maintien du biofilm. Leur synthèse accrue en présence d'As(III) est donc accompagnée par une évolution des structures en « champignon » vers des architectures plus complexes. Le génome de *Thiomonas* sp. CB2 n'étant pas séquencé et la souche ne possédant pas l'opéron de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides présents chez *Thiomonas* sp. 3As (voir **Chapitre 1. Physiologie et génomique de souches du genre *Thiomonas***), les gènes jouant un rôle dans cette synthèse n'ont pas encore été identifiés.

L'hétérogénéité des structures du biofilm conduit à l'apparition de sous-populations de cellules. Des événements de mort et lyse cellulaires localisés ont ainsi été observés au centre des structures. Ce phénomène pourrait être expliqué par une hétérogénéité métabolique du biofilm : les cellules au centre des structures sont moins actives métaboliquement que les autres et seraient donc moins en mesure de résister au stress arsénite. La résistance à ce stress nécessite en effet des processus physiologiques actifs, tels que la synthèse de l'arsénite oxydase, d'enzymes de réparation de l'ADN et de pompes d'efflux (Stolz *et al.*, 2006). Ces événements de mort et lyse cellulaires font partie intégrante de l'évolution du biofilm, libérant entre autres des acides nucléiques, qui jouent un rôle structurel essentiel dans le biofilm (Allesen-Holm *et al.*, 2006).

Simultanément à ces événements, des particules à symétrie icosaédrique de 30 nm de diamètre ont été détectées dans le surnageant de culture uniquement en présence d'As(III). Elles contiennent un fragment d'ADN simple brin, dont la taille exacte n'est pas encore définie. Leur capsid est constituée, au moins en partie, par une protéine de liaison à l'ADN simple brin homologue à la gp32 du phage T4 (Shokri *et al.*, 2009). Ces protéines se lient de manière non spécifique à l'ADN simple brin et sont impliquées dans la recombinaison, la réparation et la réPLICATION de l'ADN (Kur *et al.*, 2005). Des protéines de liaison à l'ADN simple brin interviennent notamment dans le système de réparation de l'ADN, induit lors de stress mutagènes dans le cadre de la réponse SOS (Cox, 2007). L'arsenic étant un agent mutagène, les particules observées dans le biofilm exposé à l'As(III) pourraient correspondre à un système de réparation de l'ADN. L'identification exhaustive des protéines constituant ces particules ainsi que le séquençage de l'ADN simple brin qu'elles contiennent pourraient permettre de préciser leur nature.

Suite aux événements de mort et lyse cellulaire et à la libération des particules de type phagique, une remobilisation de certaines cellules a été observée au centre des structures, dans les espaces formés lors de la lyse des cellules. Cet événement joue potentiellement un rôle dans la dispersion du biofilm. *Thiomonas* sp. CB2 possède un flagelle polaire. Alors qu'en milieu semi-solide la souche n'est pas mobile, ce qui est probablement

dû à une synthèse d'exopolysaccharides trop importante, sa mobilité est induite par l'As(III) en milieu liquide (observations non publiées réalisées en microscopie optique). La mobilité des cellules serait induite en présence d'As(III) à la fin de l'étape de maturation du biofilm, permettant la dispersion d'une partie de la population et une colonisation d'environnements moins hostiles.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---

Les biofilms bactériens sont des communautés hautement organisées permettant aux cellules de se maintenir dans une niche écologique donnée et de résister aux stress environnementaux. L'utilisation de ces structures est avantageuse dans un contexte de bioremédiation. D'une part, le développement de la population d'intérêt en biofilm garantit sa stabilité dans le système. D'autre part, les exopolysaccharides composant la matrice du biofilm présentent une capacité de fixation des polluants. Le projet COBIAS vise à développer un système biologique de traitement des eaux arsénées en utilisant un biofilm arsénite-oxydant des souches du genre *Thiomonas*. Ces souches, pour la plupart arsénite-oxydantes, sont retrouvées de manière ubiquitaire dans les milieux contaminés par l'arsenic. Certaines sont de plus capables de croissance en autotrophie en utilisant l'As(III) comme source d'énergie.

La mise au point d'un procédé de bioremédiation optimal requiert des connaissances fondamentales permettant d'anticiper le comportement des souches bactériennes d'intérêt dans le système. Dans le cadre de ce travail de thèse, la caractérisation physiologique et génomique des souches du genre *Thiomonas* a donc été réalisée. La plasticité génomique de ces souches a notamment été examinée par puces CGH, les phénomènes de remaniements génétiques étant favorisés au sein des biofilms en raison de la forte densité cellulaire de ces structures (Roberts *et al.*, 2001). En parallèle, afin d'identifier la réponse des biofilms à l'arsenic, la cinétique de formation de biofilms arsénite-oxydants a été comparée en présence et en absence d'As(III) par microscopie confocale.

Dans la première partie du travail, la caractérisation physiologique des souches du genre *Thiomonas* a révélé de fortes divergences entre ces souches phylogénétiquement proches, notamment au niveau de leur métabolisme du carbone. En effet, l'analyse du protéome des deux souches autotrophes du genre *Thiomonas* a mis en évidence une inhibition du métabolisme autotrophe de *Thiomonas* sp. 3As et une induction de celui de *Thiomonas arsenivorans* en présence d'As(III). Le lien entre les métabolismes de fixation du carbone inorganique et de l'arsenic diffère ainsi entre les souches du genre *Thiomonas*. Ce point est à prendre en considération dans le cadre d'une stratégie de bioremédiation. En effet, la concentration en matière organique de l'eau à traiter va influencer le choix de la

souche à utiliser, *Thiomonas arsenivorans* étant par exemple plus adapté que *Thiomonas* sp. 3As pour le traitement d'une eau contenant peu de matières organiques, et inversement.

La comparaison génomique de souches du genre *Thiomonas*, isolées de milieux aux propriétés physico-chimiques différentes, a corroboré ces observations physiologiques. Le séquençage du génome de *Thiomonas* sp. 3As couplé aux données des puces CGH a en effet souligné la grande plasticité génomique de ces souches. Les génomes semblent évoluer majoritairement par l'acquisition d'ilots génomiques. Ces régions mobiles contiennent des gènes clés pour la survie des souches. Les gènes *aox* et des gènes impliqués dans la résistance aux pH acides, aux métaux lourds et dans la formation de biofilms ont ainsi été retrouvés dans des îlots génomiques présents uniquement chez les souches isolées de DMAs contaminés par l'arsenic. Il ressort de cette étude que l'évolution génomique de ces souches, et donc la dynamique des îlots génomiques, est fortement influencée par les conditions environnementales. Ces résultats sont intéressants dans le cadre d'un procédé de bioremédiation. En effet, le transfert des gènes d'intérêt, notamment des gènes *aox*, au sein de la population bactérienne du système permettrait d'assurer la stabilité du bioprocédé.

L'étude de la dynamique génomique des souches du genre *Thiomonas* se poursuivra par la comparaison du génome récemment séquencé de *Tm. intermedia* K12 avec celui de *Thiomonas* sp. 3As. Ces données devraient permettre d'identifier des îlots génomiques non spécifiques aux souches retrouvées dans les DMAs et ainsi d'évaluer plus précisément l'impact de l'environnement sur les remaniements génomiques de ces souches.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, l'impact de l'arsenic sur les biofilms bactériens arsénite-oxydants a été décrit. Nous avons montré que l'As(III) affecte à des niveaux différents la cinétique de développement des biofilms. Chez les deux souches testées, l'As(III) a un impact sur le développement du biofilm via l'induction de la mobilité des cellules. Dans le cas d'*Herminiimonas arsenicoxydans*, ce phénomène retarde l'initiation du biofilm. Chez *Thiomonas* sp. CB2, la présence d'As(III) accélère la remobilisation des cellules à la fin du cycle de vie du biofilm.

Lors d'une exposition à l'As(III), *H. arsenicoxydans* privilégie le mode de vie planctonique. D'après les résultats obtenus, l'induction de la mobilité observée en présence d'As(III) est directement liée à l'activité arsénite-oxydase. Les cellules entament le processus d'adhésion lorsque tout l'As(III) a été oxydé en As(V). La détoxication du milieu semble donc prioritaire au développement d'un biofilm.

La mobilité d'une autre souche arsénite-oxydante, *Rhizobium* sp. NT-26, est également induite en présence d'As(III). Ce phénotype est plus marqué chez cette souche chimioautotrophe que chez *H. arsenicoxydans* car *Rhizobium* sp. NT-26 n'est pas mobile en absence d'As(III) (Santini *et al.*, 2000). L'impact de l'As(III) sur la formation du biofilm des deux souches pourra être comparé afin de déterminer si le retard d'adhésion observé chez *H. arsenicoxydans* en présence d'As(III) est un processus conservé. Par ailleurs, une approche de mutagénèse aléatoire et des puces à ADN devraient permettre d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la mobilité par l'As(III), éventuellement en lien avec l'activité arsénite-oxydase, chez *Rhizobium* sp. NT-26.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier le comportement d'*H. arsenicoxydans* dans un système continu, c'est-à-dire en présence de concentrations constantes en As(III), afin de déterminer si dans un système de bioremédiation les cellules sont capables d'adhérer au support en présence d'As(III).

Au contraire d'*H. arsenicoxydans*, *Thiomonas* sp. CB2 forme un biofilm plus complexe en présence qu'en absence d'As(III). Les cellules s'entourent d'une matrice extracellulaire plus importante, ce qui consolide le biofilm et permet le développement de structures élaborées. Des événements de mort et lyse cellulaires localisés, probablement liés au stress oxydatif généré par l'As(III), sont déterminants dans l'évolution du biofilm. Ils sont notamment accompagnés par la libération de particules icosaédriques contenant un brin d'ADN. Il semblerait que l'As(III) induise des processus conduisant à une dispersion plus rapide du biofilm. En effet, une remobilisation de certaines cellules a été observée uniquement dans le biofilm exposé à l'As(III).

Les approches de microscopie utilisées pour visualiser les effets de l'arsenic sur la cinétique de développement du biofilm de *Thiomonas* sp. CB2 sont essentiellement phénotypiques. Le suivi par q-RT-PCR des transcrits de gènes connus pour jouer un rôle clé

dans la formation de biofilms devrait permettre d'identifier, au moins en partie, les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus induits par l'As(III). Les gènes qui vont être testés ont été choisis d'après le génome de *Thiomonas* sp. 3As et les données des puces CGH et sont impliqués dans la mobilité (*fliF*), le quorum-sensing (*qseB*) et la résistance au stress oxydatif (*ahpC*). Enfin, le séquençage de l'ADN simple brin contenu dans les particules icosaédriques libérées par les cellules en présence d'As(III) devrait permettre de déterminer leur nature et potentiellement leur rôle dans le développement du biofilm en présence d'As(III).

A terme, ces travaux devraient permettre d'obtenir une vision globale de la réponse physiologique et moléculaire à l'arsenic des biofilms arsénite-oxydants, et plus précisément des biofilms des souches du genre *Thiomonas*. Ces données devraient faciliter la mise en œuvre d'un bioprocédé de traitement des eaux arsénierées en permettant d'anticiper le comportement de la population bactérienne d'intérêt et ainsi l'optimisation du processus. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse soulignent dès à présent plusieurs points à prendre en compte pour développer une stratégie de bioremédiation. Dans un premier temps, la variabilité de réponse des biofilms bactériens à l'As(III) a été mise en évidence. Le comportement vis-à-vis de l'As(III) des deux biofilms étudiés diffère fortement, ce qui souligne la nécessité d'identifier spécifiquement le comportement du biofilm de la souche choisie pour les processus de bioremédiation, les données n'étant pas extrapolables d'une souche à l'autre. Dans un second temps, nos résultats ne laissent pas présager d'une grande stabilité des souches du genre *Thiomonas* dans un système ouvert. D'une part, l'As(III) favorise la dispersion du biofilm. Ce phénomène accélérerait plutôt le remplacement dans le système de bioremédiation de la population d'intérêt par une communauté endogène à l'eau à traiter. D'autre part, le génome des souches du genre *Thiomonas* étant très plastique, la population devrait évoluer rapidement dans le système de bioremédiation en réponse aux fluctuations du milieu extérieur, d'autant plus que la fréquence des transferts de gènes est plus élevée au sein des biofilms. Il semble donc difficile de garantir la stabilité de la population d'intérêt dans un bioprocédé.

De manière générale, nos résultats soulignent la diversité des réponses adaptatives du monde bactérien à un même stress. Pour résister à un composé toxique, différentes stratégies peuvent être mises en œuvre, e.g. synthèse de pompes d'efflux, induction des systèmes de réparation de l'ADN, organisation des cellules en biofilms. L'importance relative de ces mécanismes est fonction du stress et varie d'une souche à une autre. Ainsi chez *H. arsenicoxydans* la réponse au stress As(III) s'articule autour de l'activité arsénite-oxydase alors que la stratégie adaptive de *Thiomonas* sp. CB2 face à ce stress repose sur la formation d'un biofilm complexe, éventuellement accompagnée par un remaniement du génome des cellules. Cette notion de variabilité dans l'adaptation des souches bactériennes aux stress est également importante pour d'autres applications, telle que la lutte contre les biofilms pathogènes dans le domaine médical.

# ANNEXE

---

**Manuscrit en cours d'évaluation**

**Diversity of metabolic interactions inside an arsenic-rich microbial ecosystem revealed by meta- and proteo- genomics**

P. N. Bertin, A. Heinrich-Salmeron, E. Pelletier, F. Goulhen-Chollet, F. Arsène-Ploetze, S. Gallien, B. Lauga, C. Casiot, A. Calteau, D. Vallenet, V. Bonnefoy, O. Bruneel, B. Chane-Woon-Ming, J. Cleiss-Arnold, R. Duran, F. Elbaz-Poulichet, N. Fonknechten, L. Giloteaux, D. Halter, M. Marchal, D. Mornico, C. Schaeffer, A. A. Thil Smith, A. Van Dorsselaer, J. Weissenbach, C. Médigue, D. Le Paslier

Soumis à *ISME Journal*

# Diversity of metabolic interactions inside an arsenic-rich microbial ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics

Philippe N. Bertin<sup>1</sup>, Audrey Heinrich-Salmeron<sup>1</sup>, Eric Pelletier<sup>2,3,4</sup>, Florence Goulhen-Chollet<sup>1</sup>, Florence Arsène-Ploetze<sup>1</sup>, Sébastien Gallien<sup>5</sup>, Béatrice Lauga<sup>6</sup>, Corinne Casiot<sup>7</sup>, Alexandra Calteau<sup>3,4,8</sup>, David Vallenet<sup>3,4,8</sup>, Violaine Bonnefoy<sup>9</sup>, Odile Bruneel<sup>7</sup>, Béatrice Chane-Woon-Ming<sup>3,4,8</sup>, Jessica Cleiss-Arnold<sup>1</sup>, Robert Duran<sup>6</sup>, Françoise Elbaz-Poulichet<sup>7</sup>, Nuria Fonknechten<sup>2,3,4</sup>, Ludovic Giloteaux<sup>6</sup>, David Halter<sup>1</sup>, Marie Marchal<sup>1</sup>, Damien Mornico<sup>3,4,8</sup>, Christine Schaeffer<sup>5</sup>, Adam Alexander Thil Smith<sup>3,4,8</sup>, Alain Van Dorsselaer<sup>5</sup>, Jean Weissenbach<sup>2,3,4</sup>, Claudine Médigue<sup>3,4,8</sup> and Denis Le Paslier<sup>2,3,4</sup>.

<sup>1</sup>Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR7156 CNRS & UdS, Strasbourg, France; <sup>2</sup>CEA, DSV, IG, Genoscope, Laboratoire de Métagénomique des Prokaryotes, France; <sup>3</sup>CNRS, UMR8030, Evry, France; <sup>4</sup>UEVE, Université d'Evry, France; <sup>5</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR7178 CNRS & UdS, Strasbourg, France; <sup>6</sup>Equipe Environnement et Microbiologie, UMR5254 CNRS & UPPA, Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, Pau, France ; <sup>7</sup>Laboratoire Hydrosciences Montpellier, UMR 5569, Montpellier, France ; <sup>8</sup>CEA, DSV, IG, Genoscope, Laboratoire de Génomique Comparative, France; <sup>9</sup>Laboratoire de Chimie Bactérienne, UPR9043 CNRS et Université de la Méditerranée, Marseille, France

Correspondence : P. N. Bertin, Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Institut de Botanique, Université de Strasbourg, 28 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France.

E-mail : [philippe.bertin@unistra.fr](mailto:philippe.bertin@unistra.fr); Phone : +33 (0)3 68 85 18 18; Fax : +33 (0)3 68 85 20 28.

**Running title**

Genomic deciphering of an arsenic-rich ecosystem

**Keywords**

Microbial genomics, extreme environment, uncultured microorganism, bacterial phylum, synecology, functional ecology

**Subject Category**

Integrated genomics and post-genomics approaches in microbial ecology

By their metabolic activities, microorganisms play a crucial role in the biogeochemical cycles of elements. The complete understanding of these processes requires however the deciphering of both the structure and the function, including synecologic interactions, of microbial communities. Using a metagenomic approach, we demonstrated here that an 5 environment highly contaminated with arsenic is dominated by seven bacterial strains whose genomes were reconstructed. Five of them represent yet uncultivated bacteria and include two strains belonging to a novel bacterial phylum present in some AMD ecosystems, and which was named *Candidatus Fodinabacter communificans*. Metaproteomic data unravelled several microbial capabilities expressed *in situ*, such as 10 iron, sulphur and arsenic oxidation that are key mechanisms in biominerilization, or organic nutrient, amino acid, and vitamin metabolism involved in synthrophic associations. A statistical analysis of all data and RT-PCR experiments allowed us to build an integrated model of the metabolic interactions that may be of prime importance in the natural attenuation of such anthropized ecosystems.

## 15      **Introduction**

Microorganisms are involved in biogeochemical nutrient cycles and play therefore a crucial role in the biosphere (Falkowski *et al.*, 2008; Haferburg and Kothe, 2007; Konopka, 2009). Although microbial ecosystems constitute a major reservoir of our planet's genetic biodiversity, it is generally recognized that most of the microorganisms present in the environment are not accessible by culture-dependent techniques. The recent developments in genomics have given an unprecedented opportunity to gain insight into the structure and the functioning of microbial communities (Allen and Banfield, 2005; Bertin *et al.*, 2008; Wilmes *et al.*, 2009). Indeed, environmental genomics has extended their analysis far beyond the sole taxonomic studies, as the whole community gene pool and its expression can now be characterized. Such approaches give rise to an integrated picture of ecosystems and are therefore of great interest to interpret the metabolisms present in ecological niches considered as extreme, including those impacted by human activities. Among the most toxic anthropogenic contaminants, arsenic is at the origin of serious forms of water pollution in industrial and post-industrial areas all over the world. In particular, high arsenic contents are encountered in mine drainage waters, where the metalloid is usually associated with sulphur, iron and other metals (Vaughan, 2006). Few forms of life are known to thrive in these often acid waters, as compared with neutral waters (Denef *et al.*, 2010; Johnson and Hallberg, 2003). In this respect, the As(III) form (arsenite) can provide chemolithotrophic organisms with energy (Silver and Phung, 2005; Stolz *et al.*, 2006).

35      The former mine of Carnoulès, Gard (France), provides an outstanding example of such an extreme environment. The sulphurous wastes contain As-rich pyrite and the leached waters are the source of a small stream called the Reigous that contains between 50 and 350 mg.l<sup>-1</sup> of soluble arsenic, mainly in the form of As(III). However, although the arsenic levels remain still high, this concentration decreases by 95% between the source of the Reigous and

40 its confluence with the river Amous, 1.5 km downstream. This natural process of attenuation  
is mainly due to microbial metabolism, leading to the oxidation of iron and arsenic into  
Fe(III) and As(V), and their co-precipitation with sulphur (Bruneel *et al.*, 2003; Casiot *et al.*,  
2003; Duquesne *et al.*, 2003). However, only a few bacteria belonging to *Thiomonas* or  
*Acidithiobacillus* genera have been isolated and characterized so far, even though 16S-based  
45 community analyses have revealed that other genera are present in this ecosystem (Bruneel *et  
al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2008). The biological activity of these  
uncultured bacteria may have a significant impact on the functioning of this ecosystem. In the  
present study, we used a multidisciplinary approach that took advantage of the "omics"  
methods, to decipher the role of uncultured microorganisms in the complex metabolic  
50 processes at work in the Carnoulès AMD, an arsenic-rich ecosystem.

## Materials and Methods

### *Sampling and chemical analysis*

Samples were collected in May 2007 at the station called COWG located 30 m downstream of  
55 the spring (Bruneel *et al.*, 2003). Five cm deep white sediments covering the bottom of the  
creek were collected using a sterile tube, and the running water (i.e. a thin column, less than 10  
cm) covering these sediments was filtered (300 mL) through sterile 0.22 µm Nuclepore filters.  
These filters were transferred into a collection tube, frozen in liquid nitrogen, and stored at -  
80°C until further analysis. This sampling was done in triplicates. The main physico-chemical  
60 parameters (pH, T°, dissolved oxygen...) were determined in the field and arsenic speciation,  
Fe(II) and sulfate analyses were performed as previously described (Bruneel *et al.*, 2008).

### *DNA isolation and sequencing*

DNA was extracted from the cellular fraction either directly using the UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), or after separation of microbial  
65 cells by Nycodenz gradient, using the Wizard Genomic DNA Extraction kit (Promega, U.S.A.), and stored at -20°C (Supplementary Information). Nebulized DNA fragments ranging from 3 and 5 kb were used to construct a genomic library and DNA inserts were sequenced, as previously described (Muller *et al.*, 2007), giving rise to 550,920 Sanger reads. In parallel, 281,758 DNA reads were obtained by GS-FLEX pyrosequencing using standard  
70 procedures. Both methods produced a total of 430.3 Mbp.

### *Clone library and phylogenetic analyses*

The bacterial diversity was analyzed by cloning and sequencing PCR amplified 16S rRNA genes (Supplementary Information). Sequences were compared with the RDP database  
75 (<http://rdp.cme.msu.edu>) and BLAST online searches (Altschul *et al.*, 1997). Phylogenies were constructed with the Molecular Evolutionary Genetics Analysis v4.0 program (Tamura *et al.*, 2007) using Maximum Composite Likelihood model and Neighbour-joining algorithm. The sequences of clones CG determined in this study were submitted to the EMBL database  
and were given Accession Numbers FN391809 to FN391849.  
80

### *Bioinformatics, statistical analysis and phylogenomic approach*

Two third of the metagenomic sequences were successfully organized in 7 bins (Supplementary Information) and were then integrated into the MicroScope platform for the prediction of coding sequences, followed by automatic and expert annotation (Vallenet *et al.*,  
85 2006). The mean polymorphism frequency in the population was assessed using SNIPer (Ning *et al.*, 2001). Molecular phylogenies were inferred using 27 universal marker genes

chosen from a reference gene set (Ciccarelli *et al.*, 2006) (Supplementary Information). For each marker, the corresponding family of homologous genes from the HOGENOM database (Perrière *et al.*, 2000) was identified. Each family dataset was then aligned with the program  
90 MUSCLE (Edgar, 2004) and filtered using the program GBLOCKS (Castresana, 2000; Talavera and Castresana, 2007). Maximum-likelihood phylogenies were reconstructed with PhyML (v2.4.4, (Guindon and Gascuel, 2003)) using the Jones–Taylor–Thornton (JTT) model of amino-acid substitution (Jones *et al.*, 1992). The metabolic network was predicted by the “Pathway Tools” software (Karp *et al.*, 2002) using MetaCyc (Caspi *et al.*, 2008) as a  
95 reference pathway database and then analysed by a Multiple Factor Analysis (MFA) from a two dimensional-matrix (Supplementary Information). DNA sequences were submitted to GenBank and were given the following ProjectIDs : 38045 - Carnoules metagenome study (top level) ; 41535 - Carnoules metagenome study, bin 1 ; 41537 - Carnoules metagenome study, bin 2 ; 41539 - Carnoules metagenome study, bin 3 ; 41541 - Carnoules metagenome  
100 study, bin 4 ; 41543 - Carnoules metagenome study, bin 5 ; 41545 - Carnoules metagenome study, bin 6 ; 41549 - Carnoules metagenome study, bin 7.

#### *Protein extraction, gel electrophoresis and mass spectrometry identification*

Proteins were extracted from cells recovered using Nycodenz gradient (Supplementary  
105 Information), separated by SDS-PAGE using 12 % gradient slab gels (PROTEAN II, Bio-Rad laboratories), stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, and *in gel* digested, as previously described (Weiss *et al.*, 2009). The resulting peptide extracts were analyzed by nanoLC-MS/MS on a nanoACQUITY Ultra-Performance-LC (UPLC, Waters, Milford, MA) coupled to SYNAPT hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass  
110 spectrometer (Waters, Milford, MA). Data were analyzed using the MASCOT 2.2.0.

algorithm (Matrix Science, London, UK) to search against a target-decoy protein database (Supplementary Information).

*PCR and reverse transcription*

115 The *rus* gene of CARN5 was PCR-amplified with iProof Polymerase High Fidelity (Biorad) using oligonucleotides RUSf : 5'-ACCCTTAGGGTGCTGCTTT-3' and RUSR: 5'-GTCGGATGCCAGGTAAAATC-3' designed on the corresponding sequences in *At. ferrooxidans* strains ATCC23270 and ATCC53993. Amplification conditions were as follows : 98°C for 30 sec, then 34 cycles (98°C for 10 sec, 68°C for 30 sec and 72°C for 30 sec) and  
120 finally 72°C for 10 min. Total RNA was extracted according to (González-Mendoza *et al.*, 2009) from the bacterial community recovered after Nycodenz® gradient density separation. Total RNA were purified using the RNEasy Mini kit (Qiagen) and digested with DNase (Fermentas). The reverse transcription of *nifQ*, *punA*, *soxC* and *cobS* transcripts was performed using SuperScript® III One-Step RT-PCR System (Invitrogen) and 5'-  
125 TTGCTGATTGTTGCTCTGG-3'/5'-TCCAGCAGACTGGACAACAC-3', 5'-  
CTCCATCCGAAAAAGTGCTC-3'/5'-AAAGAGGTTTGCTGCGGTA-3', 5'-  
ATCGACGGATTCTGGATTG-3'/5'-GGTAACGCTGCCATCTAACGC-3' and 5'-  
TTGCTGATTGTTGCTCTGG-3'/5'-TCCAGCAGACTGGACAACAC-3' primers,  
respectively. A negative control was carried out without the first reverse transcription step.  
130 Amplified fragments were sequenced by Millgen® and the resulting sequences were analyzed using BLAST program (Altschul *et al.*, 1997).

*Bacterial culture and growth medium*

Iron oxidation was tested with *At. ferrooxidans* B5 strain isolated from Carnoulès (Bruneel *et al.*, 2003). 5 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> were grown at 30°C for 5 days in 100:10 liquid medium (Schrader

and Holmes, 1988) supplemented or not with 1 mg.L<sup>-1</sup> cobalamin (Sigma), and shaken at 140 rpm. Iron oxidation was followed by the appearance of an orange precipitate and cellular growth was estimated by CFU counting.

## 140      **Results**

### *Phylogeny and genome reconstruction*

The main physico-chemical parameters (pH, T°, dissolved oxygen, iron concentration,...) were determined at the sampling site: a pH value of roughly 3.5 was measured, and arsenic, iron and sulfate concentrations reached 87, 625 and 3,209 mg.L<sup>-1</sup>, respectively (Table 1), further supporting a persistent contamination by arsenic and other inorganic elements (Casiot *et al.*, 2003). To identify the microbial species present in the ecosystem, DNA was extracted from the upper zone of sediments, 16S rRNA sequences were amplified and a clone library was built as previously described (Bruneel *et al.*, 2008). Sequence analyses revealed a dominance of bacteria belonging to the Proteobacteria phylum ( $\beta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria with 38 and 23%, respectively). Remaining clones belonged to Firmicutes (4%), and Acidobacteria (3%), and to a lesser extent to Spirochaetes (1%) and  $\alpha$ -Proteobacteria (1%). This suggests that the microbial community at Carnoulès includes a few other bacterial phyla in addition to those previously identified (Bruneel *et al.*, 2008).

To decipher the possible role of microorganisms in the biotransformation of toxic elements present at the study site, total DNA extracted from sediments was next fully sequenced. These genomic data were assembled in 7 major bins called CARN1 to CARN7, using a combination of 16S rRNA gene sequences, GC%, mean coverage of the various contigs, mean polymorphism frequency and similarity to already sequenced genomes, including *At. ferrooxidans* and *Thiomonas* sp. 3As (https://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/arsenoscope). The size of the 7 bins ranged from 1.5

Mbp to more than 4.0 Mbp and their GC content ranged from 52 to 65% (Table 2). DNA sequencing led to a low coverage for some contigs, in particular those of CARN3, which suggests that the size of the corresponding genome is underestimated. Finally, even though the sequence assembling from ecotypes cannot be excluded, each supercontig group was  
165 considered to correspond to the genome of one single major organism (Supplementary Figure S1).

We evaluated the origin of the 7 bins by a phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences obtained from both the clone library and metagenome sequencing (Figure 1), except for CARN4 whose missing rRNA sequence precluded its 16S-based classification. We also  
170 made a phylogenomic analysis of the bins using 27 universal marker genes (individually or combined) sufficiently conserved to build a tree of life (Ciccarelli *et al.*, 2006), except for CARN6 where no marker was found. Precisely, the candidates CARN2, CARN3 and CARN5 were affiliated to the  $\beta$ -Proteobacterium *Thiomonas* genus, the Acidobacteria clade and to the  $\gamma$ -Proteobacterium *At. ferrooxidans*, respectively (Supplementary Table S1). In addition, the  
175 comparison of CARN7 16S rRNA gene with sequences in the RDP database using NCBI BLAST showed that the closest cultivated microorganism belongs to the  $\beta$ -Proteobacterium *Gallionella* genus. These phylogenetic results for the bins were supported by an analysis of gene order conservation known to be correlated with evolutive distances (Huynen and Bork,  
1998).

180         Remarkably, the candidates corresponding to the CARN1 and CARN4 bins showed an important phylogenetic relationship and may represent 2 subpopulations according to the polymorphism distribution along their genome (Supplementary Figure S2). RDP Classifier indicated that those bins did not correspond to any known taxonomic phylum and, according to the metabolic properties identified in the present study (see below), this new genus was herein  
185 named *Candidatus Fodinabacter communificans* (from fodina, mine and communificare,

share), in accordance with the recommendations for incompletely characterized microorganisms (Murray and Stackebrandt, 1995).

*Metabolic potentialities of the 7 dominant bacteria and in situ expressed activities*

190 To determine the major metabolic potentialities of each bin, an in-depth *in silico* analysis of their gene content was performed. In parallel, we investigated the functioning of the bacterial community by analyzing the proteins synthesised *in situ* by all bins. This metaproteomic approach allowed the reliable identification of more than 500 unique proteins belonging to various functional classes, e.g. membrane and transport, stress response, and energy metabolism (Supplementary Tables S2ab). The experimental protein pattern was representative of the theoretical profile inferred from metagenomic data and the number of proteins identified from each bin was in agreement with the level of sequence coverage. In this respect, CARN1 and CARN4 bins, which were shown to express 70% of the identified proteins, emerged as abundant and very active in the ecosystem (Figure 2).

200 The genome of each bin was shown to contain at least one *ars* operon encoding arsenite efflux pumps and arsenate reductases. These genes are involved in arsenic resistance, and the presence of the corresponding proteins was demonstrated in protein extracts (Supplementary Table S2b). In addition, an *arsM* gene coding for an arsenite S-adenosylmethyltransferase was identified in the genome of CARN6, in agreement with the presence of methylated forms of arsenic in Carnoulès sediments, i.e. monomethylarsonate and dimethylarsinate ( $7.10^{-4}$  mg MMA and  $3.10^{-4}$  mg DMA, respectively, per mg dry weight). On the other hand, because of the structural similarity between As(V) and phosphate, arsenic metabolizing strains may preferentially transport phosphate via the specific Pst phosphate transport system rather than the Pit general transport mechanism, in order to reduce the entry

210 of As(V). Accordingly, no Pit protein was identified in metaproteomic data while several Pst  
proteins were detected (Supplementary Table S2b).

The microbial response to arsenic is known to result in various biological effects, including oxidative stress, DNA damage, exopolysaccharide synthesis and biofilm formation (Beyersmann and Hartwig, 2008; Marchal *et al.*, 2010). Metaproteomic data showed that  
215 Carnoulès strains indeed express functions protecting against general and oxidative stress, including chaperones such as DnaK or HtpG, and superoxide dismutase or thioredoxin/thioredoxin reductase. Several proteins such as RecA and DPS involved in DNA recombination and repair were also identified. In addition, several flagellar proteins synthesized by CARN1 and CARN4 were identified in protein extracts (Supplementary Table  
220 S2b), as well as a protein involved in the synthesis of Type 4 pilus expressed by *Thiomonas* sp. and known to play a role in twitching motility and adhesion (Li *et al.*, 2010). The corresponding operon, found in the genome of this bin, was also present in the genomes of CARN5 and CARN7. These adaptive processes typically depend on multiple regulatory mechanisms that allow bacteria to respond to a wide panel of stimuli. This was supported by  
225 the proteomic identification of proteins such as the nucleoid-associated proteins HU and H-NS, which play a major role in both the structure and the function of chromosomal DNA (Grove, 2010; Tendeng and Bertin, 2003). Several regulators, including alternative sigma factors such as  $\sigma^H$  and regulatory proteins belonging to the two-component systems or those involved in cell-to-cell signalling, were also expressed by various strains (Supplementary  
230 Tables S2ab), in agreement with the presence in their genome of multiple genes coding for proteins involved in stress response.

In a partly oligotrophic environment such as the Carnoulès AMD, various metabolic reactions may be needed for autotrophic metabolism. In this respect, carbon fixation depends on proteins such as ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (involved in Calvin

235 cycle), carboxysome structural proteins and carbon monoxide dehydrogenase (involved in acetyl-coenzyme A synthesis). These enzymes were identified in protein extracts, in agreement with the presence of corresponding genes in *Thiomonas* sp. (CARN2), *Acidithiobacillus* sp. (CARN5) or *Gallionella*-related (CARN7) bins. In addition, CARN5 and CARN7 may fix nitrogen by the expression of *nif* genes (Supplementary Figure S3),  
240 which encode a nitrogenase. These observations suggest that these three strains play a key role as organic compound primary producers. Nevertheless, other microorganisms may preferentially metabolize and recycle some organic compounds released by others. For example, the CARN6 bin carries the cellulase encoding gene *bczS* and the  $\alpha$ -amylase *amyM* gene, suggesting that this strain is able to metabolize complex carbohydrates. Similarly,  
245 several enzymes required for amino acid transport and metabolism were identified in the bins lacking the carbon and nitrogen fixation genetic determinants, in agreement with a mixotrophic or organotrophic metabolism. In particular, the CARN1 and CARN4 bins of *Candidatus F. communificans* contain genes such as *liv* and *opp* involved in branched amino-acid and oligopeptide transport, respectively. In addition, both strains were shown to encode  
250 multiple peptidases, such as the metallopeptidase M61 and the serine protease S41 (Supplementary Table S2b), and to express the *punA* gene (Supplementary Figure S3), which suggests that they can use purine as a carbon source (Schuch *et al.*, 1999). The CARN1 and CARN4 bins also expressed Gcv proteins of the glycine cleavage system that catalyzes the degradation of glycine and PdxS proteins involved in active vitamin B6 biosynthesis, which  
255 plays an important role in amino acid metabolism (Fitzpatrick *et al.*, 2007). Finally, the identification of multiple Krebs cycle enzymes, e.g. isocitrate, succinate and malate dehydrogenases, in CARN1 and 4 also argues in favour of an organotrophic metabolism in *Candidatus F. communificans*.

A wide diversity of bioenergetic electron chains may be needed to accommodate the fluctuations in physico-chemical parameters. Accordingly, several terminal oxidases might be operative in all strains of the Carnoulès microorganisms, e.g. the cytochrome oxidase *cox* and *cta* operons and the *cyo* and *cyd* operons encoding quinol oxidases. The identification of several NADH-ubiquinone and cytochrome *c* oxidases in protein extracts supports the existence of aerobic metabolism at the sampling site (Supplementary Table S2b).

Nevertheless, several operons involved in anaerobic respiration were identified, in particular those in CARN2 and CARN7 bins required in the metabolism of nitrate and nitrite, such as *ntr*, *nar*, and *nas*, or the use of fumarate as an electron acceptor. On the other hand, possible inorganic electron donors may comprise sulphur compounds. This is supported by the presence in *Thiomonas* sp. (CARN2), *Acidithiobacillus* sp. (CARN5) or *Gallionella*-related sp. (CARN7) and the expression (Supplementary Figure S3) of genes such as *sor*, *sox*, *tetH* or *sqr* involved in the oxidation of reduced inorganic sulphur compounds, e.g. sulfide, sulphur, sulphite, thiosulphate or tetrathionate. The oxidation of H<sub>2</sub> to protons may also be a source of energy due to the presence in CARN2, CARN5 and CARN6 of several hydrogenase-encoding genes, in particular *hox* and *hup* operons (Friedrich and Schwartz, 1993). Finally, the CARN7 bin harbours a *dsrABEFHCMKLJOPN* operon. The DsrA protein showed 72% similarity with ortholog in the sulphur-oxidising *Thiobacillus denitrificans*. This suggests that the *Gallionella*-related strain is also able to use sulphur compounds as electron donor in its energy metabolism, as suggested in *Gallionella ferruginea* (Lutters-Czekalla, 1990).

Additionally, arsenite may constitute a possible inorganic electron donor and arsenite oxidases possibly involved in the bioenergetic transformation of As(III) to As(V) were shown to be expressed by the sole *Thiomonas* sp. (CARN2). In contrast, no respiratory arsenate reductase, which allows anaerobic respiration of As(V), was identified in any of the 7 bins. Importantly, the *Acidithiobacillus* sp. bin (CARN5) expressed the sole RusA protein

(Supplementary Table S2b), which is involved in electron transport with iron used as an  
285 energy source. This suggests a major role of CARN5 in the iron oxidation observed at Carnoulès (Duquesne *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2003). Nevertheless, a cytochrome synthesized by CARN7 was also identified in protein extracts. Despite a low similarity (i.e.  
290 34 %) with the Cyt<sub>572</sub> protein of *Lesptospirillum* sp. involved in iron oxidation (Jeans *et al.*, 2008), we cannot rule out that additional proteins may be involved in this process in the AMD under study.

#### *Synergistic interactions within the microbial community*

Autotrophic, mixotrophic or heterotrophic metabolisms present at Carnoulès suggest the existence of metabolic and nutrient exchanges that may be of prime importance inside the  
295 microbial community, revealing the importance of syntrophic relationships. To support and extend these observations, a Multiple Factor Analysis (MFA) of both metagenomic and metaproteomic data was performed on a two dimensional-matrix combining bins and enzymatic reactions. The most discriminant axes, i.e. capturing the highest dispersion in the resulting dot cloud, suggest an important and specific role for each organism inside the  
300 Carnoulès community. Indeed, factorial planes segregated CARN2 from the other bins (Figure 3) and separated CARN1-CARN4 from CARN5-CARN7. In addition, CARN3 was opposed to CARN6, revealing CARN6-specific reactions (Figure 3). No such correlation was observed between our data and those from the acidic AMD biofilm (Denef *et al.*, 2010; Tyson *et al.*, 2004), which further supports the marked difference between these two ecosystems  
305 (Supplementary Figure S4). From the variable classification results, several clusters of reactions were then associated to bin groups. These include, for example, Cluster A4 which is linked to CARN2 (energy metabolism, inorganic nutrient metabolism and arsenic detoxification) (Supplementary Table S3a), and Cluster A1 which groups reactions common

to CARN2 and CARN5 (Calvin-Benson-Bassham cycle and urea degradation pathways). In  
310 addition, Cluster A5 contains CARN6-specific reactions, such as those involved in cellulose  
metabolism, while Clusters A6, B1 and B4 include reactions related to lysine fermentation  
and to other amino acid or nucleoside degradation pathways in CARN1 and CARN4, and also  
gather reactions related to cobalamin biosynthesis (Supplementary Table S3b). Indeed, the  
CARN1 and CARN4 bins carry the *cobSTU* operon involved in cobalamin (vitamin B12)  
315 synthesis (Escalante-Semerena, 2007), which was shown to be expressed *in situ*  
(Supplementary Figure S3). Remarkably, iron oxidation catalysed by *At. ferrooxidans* was  
strongly increased in the presence of cobalamin (Supplementary Figure S5). These data  
suggest that this vitamin synthesized by CARN1 and CARN4 may be used by CARN5,  
leading to an increase in iron oxidation.

320

## Discussion

The last few years, a huge amount of genomic sequences have been published in databases,  
including a complete characterization of several bacteria metabolizing arsenic (Arsène-  
Ploetze *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2007). In microbial ecology, the major challenge remains  
325 however to determine more precisely the role of microorganisms and their relationships with  
other members of the microbial community that result in an efficient functioning of the  
ecosystem. In this respect, metagenomic approaches based on high-throughput technologies  
may be of great interest in synecology since they allow to investigate the role of complex  
microbe consortia as a whole, including that of uncultured microorganisms in the processes  
330 taking place *in situ*. In the present study, we performed an in-depth analysis of descriptive and  
functional genomic data that allowed us to identify the dominant microorganisms present in  
an arsenic-contaminated ecosystem (Figure 4). Some of them belong to bacterial genera  
already characterized, e.g. *Thiomonas* (CARN2) and *Acidithiobacillus* (CARN5). Others

correspond however to uncultured microorganisms related to *Gallionella* sp. (CARN7) and  
335 the first representative of a novel bacterial phylum, here named *Candidatus* F. *communicans*  
(CARN1 and CARN4). Interestingly, only two 16S rRNA sequences (97% similarity) similar  
to CARN1 are present in databases and originate from other acid mine environments,  
suggesting that this uncultivated bacterium is widespread in such ecosystems. Finally, the  
presence at the study site of 2 subpopulations of a same strain, i.e. *Candidatus* F.  
340 *communicans* (Supplementary Figures S1 and S2), is reminiscent to what has been observed  
in other environmental contexts (Simmons *et al.*, 2008; Wilmes *et al.*, 2008). Such ecotypes,  
which may reflect an important genetic variability resulting from gene gain or loss, has been  
recently described in *Thiomonas* strains (Arsène-Ploetze *et al.*, 2010).

Metagenomic and metaproteomic data emphasized the diversity of mechanisms that  
345 may be active *in situ*, allowing the 7 dominant bacteria to adapt their metabolic activities to  
changes in environmental conditions (Figure 4). One example concerns the ability of  
microorganisms to live in organized surface communities called biofilms, where aggregated  
cells are embedded in an exopolymeric matrix. Such a lifestyle confers them an higher  
resistance to various environmental stresses (Harrison *et al.*, 2007) and favours the physical  
350 interactions between the cells (Davey and O'toole, 2000). In addition, flagellum biosynthesis  
and motility are often known to play a role in the first steps of biofilm formation (Soutourina  
and Bertin, 2003). Metagenomics revealed that most bins contain multiple flagellar and pili  
genes and metaproteomics allowed us to identify the corresponding proteins in  
CARN1/CARN4 and in CARN2, respectively (Supplementary Table S2b). While no flagellar  
355 operon was identified in *Acidithiobacillus* sp. (CARN5), as it may be observed in already  
sequenced related bacteria (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/arsenoscope>), this bin  
contains several genes such as *galE* and *pgm* involved in capsular biosynthesis in *At.*

*ferrooxidans* (Barreto *et al.*, 2005), suggesting a role of this strain in the formation of a biofilm.

360 More importantly, combined with Multiple Factorial Analysis of the data, our observations demonstrated the metabolic partnerships that may exist inside an arsenic-rich environment at the benefit of the microbial community as a whole. These processes include the fixation of inorganic carbon and nitrogen by several strains, in particular those belonging to the *Thiomonas* (CARN2), *Acidithiobacillus* (CARN5) and *Gallionella*-related (CARN7) genera. Indeed, these strains were shown to synthesize proteins such as the Rubisco, i.e. 365 ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase. This enzyme of the Calvin cycle catalyzes the first step of carbon fixation. In addition, the genome of CARN5 and CARN7 also contain the *nif* genes, which encode a nitrogenase and were shown to be expressed *in situ*. This further supports a key role of these organisms in nitrogen cycle inside the Carnoulès community.

370 Their autotrophic metabolisms may be essential to reach an equilibrium between auto- and heterotrophy providing other partners with organic nutrients. In this respect, the presence of *fucP* and *exuT* genes coding for L-fucose and hexuronate transporters, respectively, in CARN3 may support, at least in part, the carbon requirements of this organism. In addition, CARN6 carries the cellulase encoding gene *bczS* and the  $\alpha$ -amylase *amyM* gene, suggesting 375 its ability to metabolize more complex carbohydrates.

376 Remarkably, our results highlighted the role of several members of the Carnoulès community in the recycling of both mineral and organic resources such as arsenic, iron, sulphur, urea, vitamins, nucleosides and amino acids (Figure 4). In this respect, the arsenite oxidase activity expressed by *Thiomonas* sp. (CARN2) associated with metabolisms such as 380 iron oxidation by *Acidithiobacillus* sp. (CARN5) and sulphur oxidation by both strains and the *Gallionella*-related strain (CARN7), seems to be of prime importance in the partial but efficient attenuation of the arsenic-contaminated ecosystem, leading to the co-precipitation of

these inorganic elements (Bruneel *et al.*, 2003; Casiot *et al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2003). Other microorganisms, in particular *Candidatus* F. communificans, may recycle organic  
385 compounds released by others or provide them with essential cofactors. First, CARN1 and CARN4 bins expressed genes involved in branched-chain amino acid and oligopeptide transport. Second, and unlike other Carnoulès bins, their genome carries *drm* and *punA* genes, suggesting that they can use purine as a carbon source (Schuch *et al.*, 1999). Third, genes involved in amino acid fermentation were also identified in both bins, e.g. those of the lysine  
390 pathway which converts lysine into butyrate, acetate and ammonia, principally in obligate anaerobic bacteria (Kreimeyer *et al.*, 2007). Fourth, the CARN1 and CARN4 bins of *Candidatus* F. communificans carry the arginase-encoding gene *rocF* involved in urea biosynthesis, while a complete urease-encoding *ure* operon was present in *Thiomonas* sp. bin (CARN2). Fifth, genes involved in cobalamin biosynthesis, including the *cobSTU* operon,  
395 were identified in both CARN1 and CARN4 bins while BtuC cobalamin transporters are possibly encoded by others bins such as *Thiomonas* (CARN2) and *Acidithiobacillus* sp. (CARN5), as it may be observed in already sequenced related bacteria (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/arsenoscope>). In addition, cobalamin was shown to strongly activate iron oxidation in *At. ferrooxidans*, the first step in the natural remediation  
400 observed at the study site. Such a metabolic cooperation may thus be of prime importance in the natural biomineralization observed at Carnoulès. Finally, cobalamin biosynthesis may also be useful to eukaryotes, in particular *Euglena* sp. present at the study site (Casiot *et al.*, 2004) whose cell cycle is known to require this cofactor (Bré *et al.*, 1981; Olaveson and Stokes,  
1989).

405 Taken together, our data provide evidence that at least 7 bacteria are involved in the functioning of the AMD ecosystem under study. In particular, our observations support the existence of multiple metabolic cooperations between the Carnoulès microorganisms (Fig. 4)

and an indirect but crucial role of the first representative of a novel and uncultured bacterial phylum in the biomineralization processes in this arsenic-rich ecosystem. In the future,  
410 descriptive and functional genomic approaches such as those presented here should give an integrated view of the biological objects present in any environment, their relationships, their role in the nutrient biogeochemical cycles and their possible use in the development of novel methods of bioremediation. More routinely used, such strategies will lead to important advances in microbial ecology, revealing what was recently regarded as impossible to  
415 explore.

## Acknowledgements

A.H.-S., J.C.-A. and D.H. were supported by a grant from the French Ministry of Education and Research and M.M. and F.G.-C. by a grant from the Agence Nationale de la Recherche  
420 (ANR). Financial support came from the Université de Strasbourg (UdS), the Consortium National de Recherche en Génomique (CNRG), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) in the frame of the RARE and MicroScope projects. This work was done in the frame of the « Groupement de Recherche - Métabolisme de l’Arsenic chez les Microorganismes (GDR2909-CNRS) »  
425 (<http://gdr2909.u-strasbg.fr>).

Supplementary Information is available at the ISME J.’s website.

## References

- 430 Allen EE, Banfield JF (2005). Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 489-498.
- 435 Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W *et al* (1997). Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- 440 Arsène-Ploetze F, Koechler S, Marchal M, Coppée J-Y, Chandler M, Bonnefoy V *et al* (2010). Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome. *PLoS Genet* **6**: e1000859.
- 445 Barreto M, Jedlicki E, Holmes DS (2005). Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2902-2909.
- Bertin PN, Médigue C, Normand P (2008). Advances in environmental genomics: towards an integrated view of micro-organisms and ecosystems. *Microbiology* **154**: 347-359.
- Beyersmann D, Hartwig A (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* **82**: 493-512.
- 450 Bré MH, El Ferjani E, Lefort-Tran M (1981). Sequential protein-dependent steps in the cell cycle initiation and completion of division in vitamin B12 replenished *Euglena gracilis*. *Protoplasma* **108**: 301-318.
- 455 Bruneel O, Pascault N, Egal M, Bancon-Montigny C, Goñi-Urriza MS, Elbaz-Poulichet F *et al* (2008). Archaeal diversity in a Fe-As rich acid mine drainage at Carnoulès (France). *Extremophiles* **12**: 563-571.
- 460 Bruneel O, Personné JC, Casiot C, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, Mahler BJ *et al* (2003). Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J. Appl. Microbiol.* **95**: 492-499.
- Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F (2004). Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoules, France). *Sci. Total Environ.* **320**: 259-267.
- 465 Casiot C, Morin G, Juillot F, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M *et al* (2003). Bacterial immobilization and oxidation of arsenic in acid mine drainage (Carnoulès creek, France). *Water Res.* **37**: 2929-2936.
- 470 Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Kaipa P, Krummenacker M, Latendresse M *et al* (2008). The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases *Nucleic Acids Res.* **36**: D623-D631.
- 475 Castresana J (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 540-552.

- Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**: 1283-1287.
- 480 Davey ME, O'toole GA (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867.
- Denef VJ, Mueller RS, Banfield JF (2010). AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME J.* **4**: 599-610.
- 485 Duquesne K, Lebrun S, Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M *et al* (2003). Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance in acid mine drainage. *Appl. Env. Microbiol.* **69**: 6165-6173.
- 490 Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, Muller D, Lett MC, Bonnefoy V (2008). Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ. Microbiol.* **10**: 228-237.
- 495 Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792-1797.
- Escalante-Semerena JC (2007). Conversion of cobinamide into adenosylcobamide in Bacteria and Archaea. *J. Bacteriol.* **189**: 4555-4560.
- 500 Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* **320**: 1034-1039.
- Fitzpatrick TB, Amrhein N, Kappes B, Macheroux P, Tews I, Raschle T (2007). Two independent routes of denovo vitamin B6 biosynthesis: not that different after all. *Biochem. J.* **407**: 1-13.
- 505 Friedrich B, Schwartz E (1993). Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 351-383.
- 510 González-Mendoza D, Morales-Trejo A, Brito-Vera H (2009). A rapid and efficient method for isolation of total RNA from *Euglena gracilis* (Euglenoidea). *Genet. Mol. Res.* **8**: 482-486.
- Grove A (2010). Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**: 1-12.
- 515 Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **52**: 696-704.
- 520 Haferburg G, Kothe E (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* **47**: 453-467.
- Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microb.* **5**: 928-938.
- 525 Huynen MA, Bork P (1998). Measuring genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 5849-5856.

- 530 Jeans C, Singer SW, Chan CS, VerBerkmoes NC, Shah M, Hettich RL *et al* (2008). Cytochrome 572 is a conspicuous membrane protein with iron oxidation activity purified directly from a natural acidophilic microbial community. *ISME J* **2**: 542-550.
- Johnson DB, Hallberg KB (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* **154**: 466-473.
- 535 Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **8**: 275–282
- Karp P, Paley S, Romero P (2002). The Pathway Tools Software. *Bioinformatics* **18**: S1-S8.
- 540 Konopka A (2009). What is microbial community ecology? *The ISME J.* **3**: 1223–1230.
- 545 Kreimeyer A, Perret A, Lechaplain C, Vallenet D, Médigue C, Salanoubat M *et al* (2007). Identification of the last unknown genes in the fermentation pathway of lysine. *J. Biol. Chem.* **282**: 7191-7197.
- 550 Li Y-Q, Wan D-S, Huang S-S, Leng F-F, Yan L, Ni Y-Q *et al* (2010). Type IV Pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence. *Curr. Microbiol.* **60**: 17-24.
- Lutters-Czekalla S (1990). Lithoautotrophic growth of the iron bacterium *Gallionella ferruginea* with thiosulfate or sulfide as energy source. *Arch. Microbiol.* **154**: 417-421.
- 555 Marchal M, Briandet R, Koechler S, Kammerer B, Bertin PN (2010). Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *Microbiology* **156**: 2336 - 2342.
- 560 Morin G, Juillot F, Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Elbaz-Poulichet F *et al* (2003). Bacterial formation of tooeleite and mixed arsenic(III) or arsenic(V)-iron(III) gels in the Carnoulès acid mine drainage, France. A XANES, XRD, and SEM study. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 1705-1712.
- Muller D, Médigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E *et al* (2007). A tale of two oxydation states : bacterial colonization of arsenic-rich environment. *PLoS Genet.* **3**: e53: 518-530.
- 565 Murray RGE, Stackebrandt E (1995). Taxonomic note: Implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described prokaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 186-187.
- Ning Z, Cox AJ, Mullikin JC (2001). SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res.* **11**: 1725-1729.
- 570 Olaveson MM, Stokes PM (1989). Responses of the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3. *J. Phycol.* **25**: 529-539.
- 575

- Perrière G, Duret L, Gouy M (2000). HOBACGEN: Database system for comparative genomics in bacteria. *Genome Res.* **10**: 379-385.
- 580 Schrader JA, Holmes DS (1988). Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **170**: 3915-3923.
- Schuch R, Garibian A, Saxild HH, Piggot PJ, Nygaard P (1999). Nucleosides as a carbon source in *Bacillus subtilis*: characterization of the *drm-pupG* operon. *Microbiology* **145**: 2957-2966.
- 585 Silver S, Phung LT (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 599-608.
- 590 Simmons SL, DiBartolo G, Denef VJ, Goltsman DSA, Thelen MP, Banfield JF (2008). Population genomic analysis of strain variation in *Leptospirillum* Group II bacteria involved in acid mine drainage formation. *PLoS Biol.* **6**: e177.
- Soutourina OA, Bertin PN (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 505-523.
- 595 Stolz JF, Basu P, Santini JM, Oremland RS (2006). Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annual Review of Microbiology* **60**: 107-130.
- Talavera G, Castresana J (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and 600 ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* **56**: 564-577.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- 605 Tendeng C, Bertin PN (2003). H-NS in Gram-negative bacteria: A family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol.* **11**: 511-518.
- Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM *et al* (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the 610 environment. *Nature* **428**: 37-43.
- Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, Cruveiller S *et al* (2006). MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res.* **34**: 53-65.
- 615 Vaughan DJ (2006). Arsenic. *Elements* **2**: 71-75.
- Weiss S, Carapito C, Cleiss J, Koechler S, Turlin E, Coppee J-Y *et al* (2009). Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite-oxidizing strain *Herminiimonas arsenicoxydans* by proteomics data. *Biochimie* **91**: 192-203.
- 620 Wilmes P, Andersson AF, Lefsrud MG, Wexler M, Shah M, Zhang B *et al* (2008). Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *ISME J* **2**: 853-864.
- 625

Wilmes P, Simmons SL, Denef VJ, Banfield JF (2009). The dynamic genetic repertoire of microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 109-132.

630

630 **Titles and legends to figure**

**Figure 1** Phylogenetic tree representing the taxonomic affiliation of the Carnoulès community microorganisms. The 16S rRNA gene sequences were obtained from DNA sediments after PCR amplification (clones CG-X) or metagenomic sequencing (CARN bins, 635 except for CARN4, see text). A total of 759 positions in the final dataset were obtained after all positions containing gaps and missing data were eliminated. The distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and the tree was inferred using the Neighbor-Joining method. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per site. Percentages of 1000 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each 640 analysis are shown above or near the relevant nodes. Bootstrap values are shown for branches with more than 50% bootstrap support.

**Figure 2** Experimental metaproteomic pattern obtained by MS/MS identification of the proteins expressed *in situ* (CARN1, green; CARN2, orange; CARN3, black; CARN4, pink; 645 CARN5, light blue; CARN6, brown and CARN7, blue). As a background, the theoretical distribution predicted from metagenomic data is represented in grey.

**Figure 3** Multiple Factorial Analysis of the 7 Carnoulès bins, performed on a two-dimensional matrix combining bins and enzymatic reactions, respectively. To highlight 650 possible metabolic distinctions between bins, 3 axes (F1 to F3) capturing the highest dispersion in the resulting dot cloud were selected; they represent more than half the total dispersion. Colored lines represent the vectors corresponding to the enzymatic reaction frequencies, the concentric disks differentiating those identified in the metaproteomic data. The reaction vectors were then hierarchically clustered, which led to 7 and 9 classes

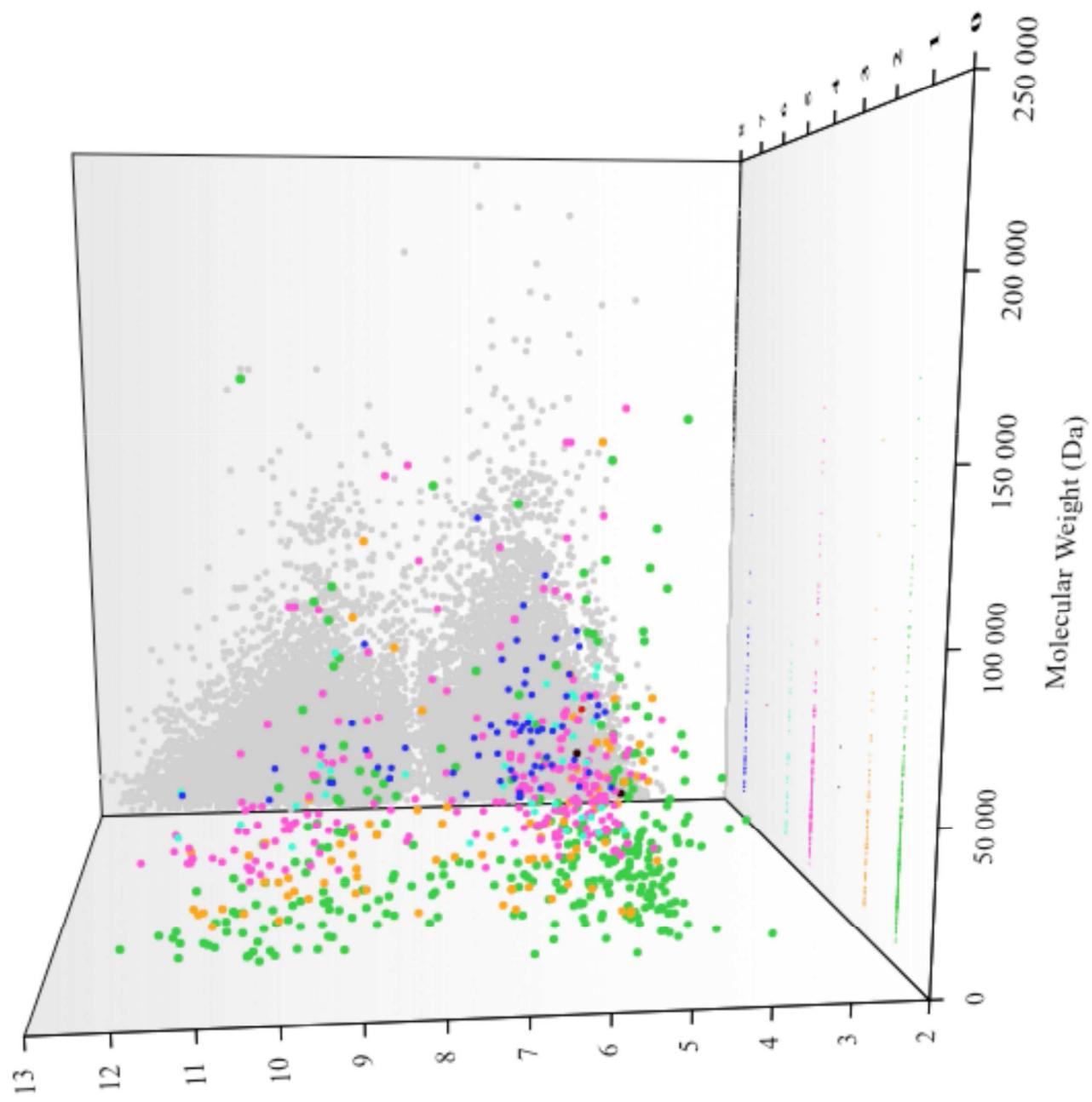
655 (indicated by the colors) for the first and second factorial planes, respectively. The  
corresponding functions are listed in Supplementary Tables S3ab. For example, Cluster A4 is  
linked to CARN2 (energy metabolism, inorganic nutrient metabolism and arsenic  
detoxification); Cluster A1 groups reactions common to CARN2 and CARN5 (Calvin-  
Benson-Bassham cycle and urea degradation pathways); Cluster A5 contains CARN6-  
660 specific reactions (cellulose metabolism), and Clusters A6, B1 and B4 include reactions in  
CARN1 and CARN4 (lysine fermentation other amino acid or nucleoside degradation  
pathways, and cobalamin biosynthesis).

**Figure 4** Model of the Carnoulès bacterial community highlighting the major functions  
665 identified by metagenome sequencing or metaproteome characterization. These activities  
include carbon and nitrogen fixation, energy metabolism, flagellum and capsule biosynthesis,  
amino acid transport and degradation, detoxification and stress response, arsenic and iron  
metabolism. The possible interactions between these microorganisms or with other chemical  
or biological components present on the study site are indicated by arrows. CARN bins are  
670 numbered from 1 to 7.

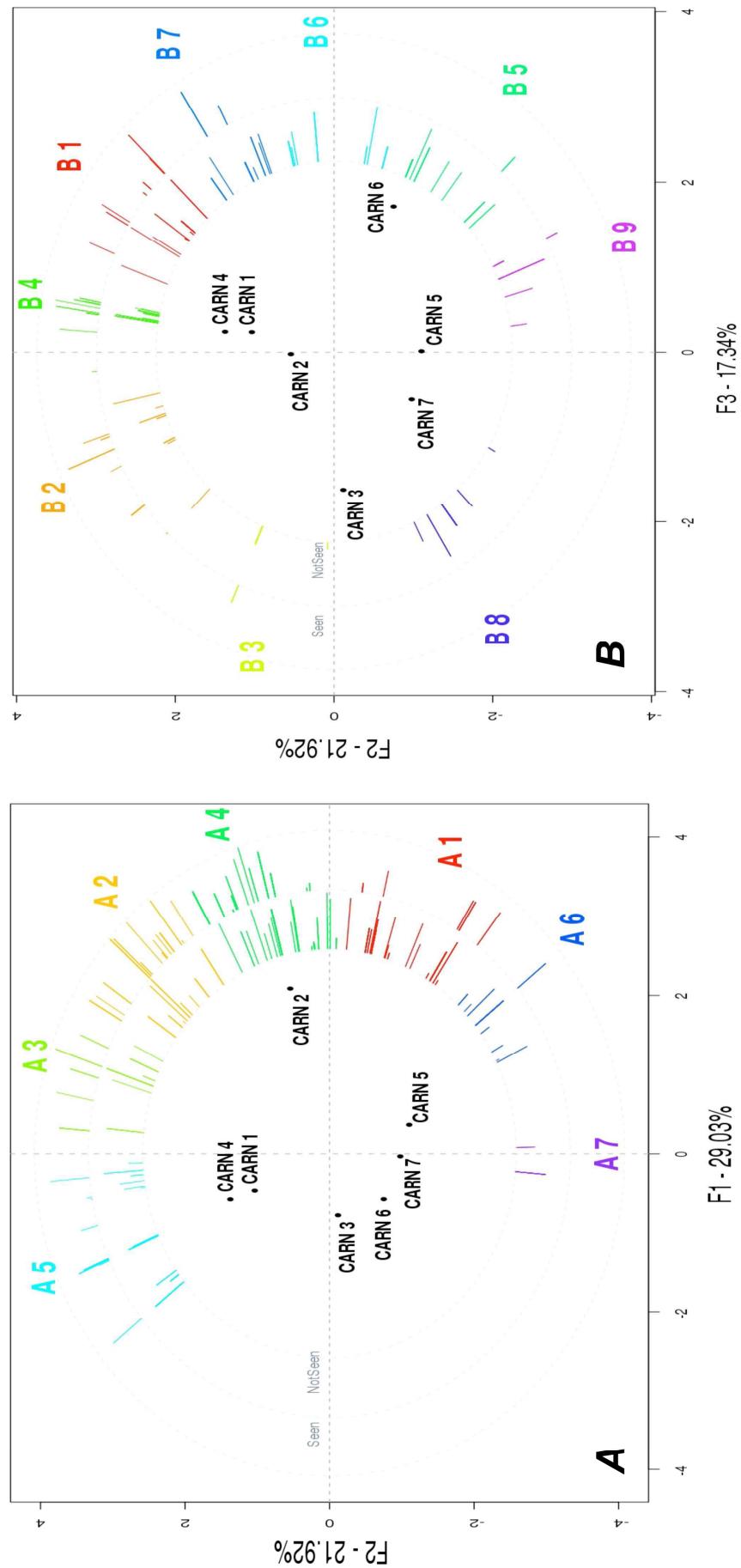
**Figure 1**



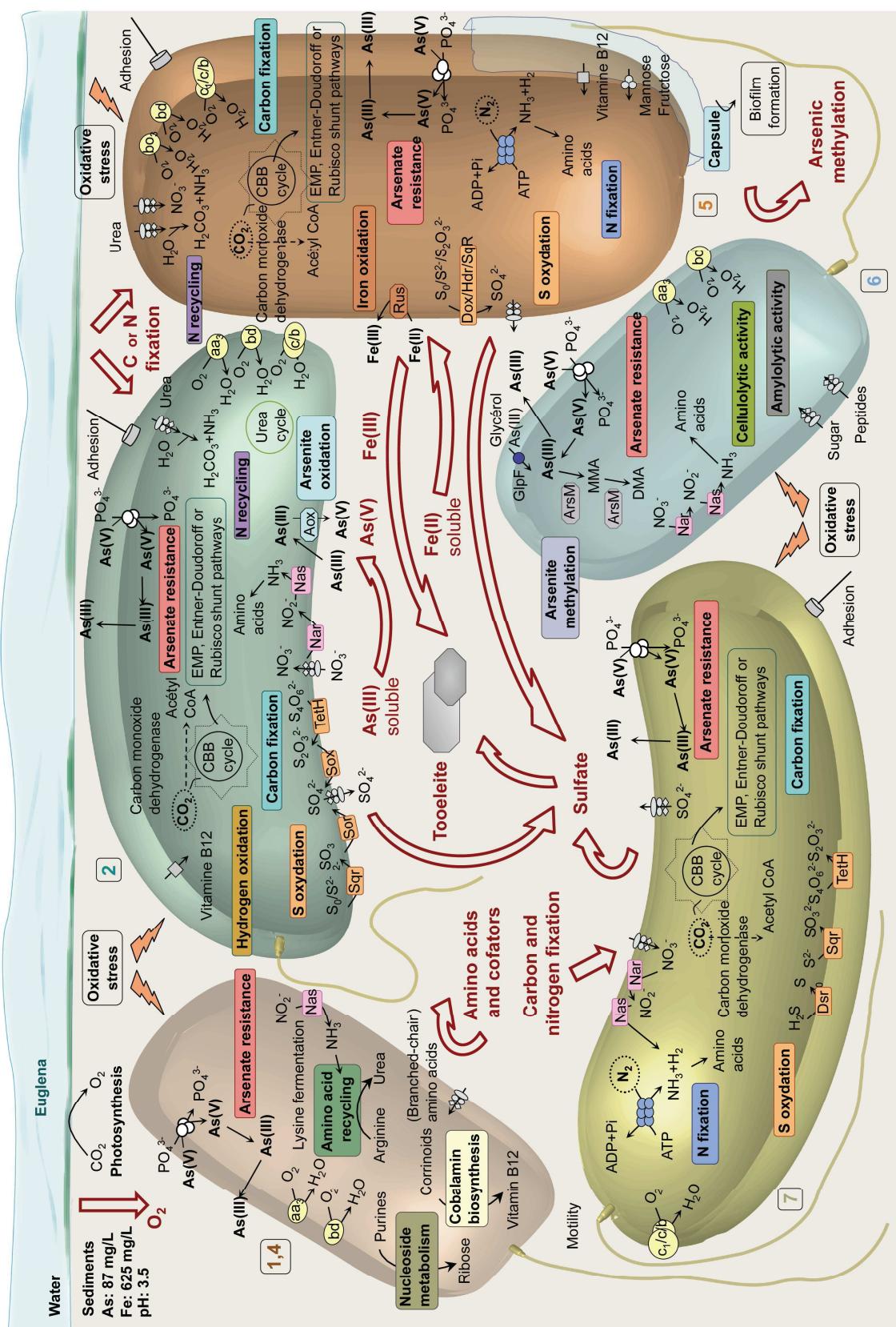
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



**Table 1** Physico-chemical characteristics of the Carnoules water during the sampling at COWG

pH	T (°C)	DO <sup>1</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	Eh <sup>2</sup> (mV)	As(III) (mg.l <sup>-1</sup> )	As(V) (mg.l <sup>-1</sup> )	Fe(II) (mg.l <sup>-1</sup> )	Fe(III) (mg.l <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )
3.83	15.1	8.3	459	71 ( $\pm 4$ )	16 ( $\pm 1$ )	625( $\pm 30$ )	<DL	3209 ( $\pm 300$ )

<sup>1</sup> Dissolved oxygen<sup>2</sup> Redox potential

**Table 2** General features of the 7 Carnouïès bins

	Carnouïès 1	Carnouïès 2	Carnouïès 3	Carnouïès 4	Carnouïès 5	Carnouïès 6	Carnouïès 7
<b>Number of base pairs</b>	2558671	4069759	1567831	2760933	2984465	2824537	2708310
<b>G+C content (%)</b>	62.13 2664	64.66 4302	58.55 1498	61.89 2806	58.4 3292	58.51 2851	51.7 2949
<b>Nb. of predicted protein-coding genes</b>	1561 (36.29 %)	781 (52.14 %)	1359 (48.43 %)	1500 (45.57 %)	1531 (53.70 %)	1322 (44.83 %)	

	Carnouïès 1	Carnouïès 2	Carnouïès 3	Carnouïès 4	Carnouïès 5	Carnouïès 6	Carnouïès 7
<b>Cellular processes and signaling</b>							
Cell cycle control, cell division, Chromosome partitioning	33 (1.24)	50 (1.16)	9 (0.06)	49 (1.75)	46 (1.4)	38 (1.33)	51 (1.73)
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	139 (5.22)	202 (4.7)	70 (4.67)	177 (6.31)	193 (5.86)	153 (5.37)	137 (4.65)
Cell motility	60 (2.25)	112 (2.6)	29 (1.94)	61 (2.17)	53 (1.61)	63 (2.21)	97 (3.29)
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	101 (3.79)	177 (4.1)	46 (3.07)	119 (4.24)	136 (4.13)	88 (3.09)	118 (4)
Signal transduction mechanisms	121 (4.54)	230 (5.35)	55 (3.67)	121 (4.31)	100 (3.04)	105 (3.68)	156 (5.29)
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	62 (2.33)	120 (2.79)	52 (3.47)	79 (2.82)	131 (3.98)	89 (3.12)	104 (3.56)
Defense mechanisms	56 (2.1)	107 (2.49)	36 (2.4)	66 (2.35)	74 (2.25)	59 (2.07)	62 (2.1)
Extracellular structures	1 (0.04)	1 (0.02)	1 (0.07)	3 (0.11)	2 (0.06)	1 (0.04)	1 (0.03)
RNA processing and modification	1 (0.02)			1 (0.03)	1 (0.03)	1 (0.03)	1 (0.03)
<b>Information storage and processing</b>							
Chromatin structure and dynamics	1 (0.04)	1 (0.02)		1 (0.04)	1 (0.03)	1 (0.03)	
Translation, ribosomal structure and biogenesis	161 (6.04)	177 (4.1)	73 (4.87)	166 (5.92)	161 (4.89)	75 (2.63)	103 (3.49)
Transcription	120 (4.5)	230 (5.35)	66 (4.41)	148 (5.27)	141 (4.28)	109 (3.82)	143 (4.85)
Replication, recombination and repair	202 (7.58)	372 (8.65)	99 (6.61)	182 (6.49)	272 (8.26)	264 (9.26)	307 (10.41)
<b>Metabolism</b>							
Energy production and conversion	161 (6.04)	335 (7.79)	64 (4.27)	177 (6.31)	199 (6.05)	149 (5.23)	172 (5.83)
Amino acid transport and metabolism	313 (11.75)	488 (11.34)	120 (8.01)	309 (11.01)	277 (8.41)	214 (7.51)	207 (7.02)
Nucleotide transport and metabolism	69 (2.59)	94 (2.19)	25 (1.67)	61 (2.17)	73 (2.22)	63 (2.21)	63 (2.14)
Carbohydrate transport and metabolism	139 (5.22)	232 (5.39)	101 (6.74)	173 (6.17)	171 (5.19)	107 (3.75)	125 (4.24)
Coenzyme transport and metabolism	108 (4.05)	152 (3.53)	42 (2.8)	110 (3.92)	113 (3.43)	72 (2.53)	102 (3.46)
Lipid transport and metabolism	112 (4.20)	164 (3.81)	36 (2.4)	112 (3.99)	75 (2.28)	63 (2.21)	65 (2.2)
Inorganic ion transport and metabolism	117 (6.64)	322 (7.48)	78 (5.21)	183 (6.52)	231 (7.02)	136 (4.77)	158 (5.36)
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	64 (2.40)	132 (3.07)	29 (1.94)	76 (2.71)	68 (2.07)	36 (1.26)	44 (1.49)



## **REFERENCES**

---

- Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D. & other authors (1999).** Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect* **107**, 593-597.
- Allegrucci, M. & Sauer, K. (2007).** Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **189**, 2030-2038.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2006).** A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**, 1114-1128.
- Allison, D. G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A. & Gilbert, P. (1998).** Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **167**, 179-184.
- Alsteens, D., Dague, E., Rouxhet, P. G., Baulard, A. R. & Dufrêne, Y. F. (2007).** Direct Measurement of Hydrophobic Forces on Cell Surfaces Using AFM. *Langmuir* **23**, 11977-11979.
- Anderson, G. G. & O'Toole, G. A. (2008).** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 85-105.
- Arsène-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M. & other authors (2010).** Structure, Function, and Evolution of the *Thiomonas* spp. Genome. *PLoS Genet* **6**, e1000859.
- Baker, M. D., Wolanin, P. M. & Stock, J. B. (2006).** Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* **28**, 9-22.
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. (2004).** Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**, 1622-1625.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. & Jarrell, K. F. (2003).** Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**, 295-304.
- Barkay, T. & Schaefer, J. (2001).** Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr Opin Microbiol* **4**, 318-323.
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L. & other authors (2008).** Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* **10**, 2331-2343.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2009).** Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* **191**, 7333-7342.
- Battaglia-Brunet, F., Dictor, M. C., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser, K., Clarens, M. & Baranger, P. (2002).** An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 656-667.
- Battaglia-Brunet, F., Joulian, C., Garrido, F., Dictor, M. C., Morin, D., Coupland, K., Barrie Johnson, D., Hallberg, K. B. & Baranger, P. (2006).** Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 99-108.

- Bayles, K. W. (2007).** The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **5**, 721-726.
- Belas, R. & Suvanasuthi, R. (2005).** The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J Bacteriol* **187**, 6789-6803.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & van Oss, C. J. (1996).** Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B* **7**, 47-53.
- Bentley, R. & Chasteen, T. G. (2002).** Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 250-271.
- Beyenal, H. & Lewandowski, Z. (2004).** Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water Res* **38**, 2726-2736.
- Beyenal, H., Sani, R. K., Peyton, B. M., Dohnalkova, A. C., Amonette, J. E. & Lewandowski, Z. (2004).** Uranium immobilization by sulfate-reducing biofilms. *Environ Sci Technol* **38**, 2067-2074.
- Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. (2004).** Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16630-16635.
- Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. (2005).** Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* **57**, 1210-1223.
- Boles, B. R. & Horswill, A. R. (2008).** agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* **4**, e1000052.
- Boles, B. R. & Singh, P. K. (2008).** Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12503-12508.
- Boyer, R. R., Sumner, S. S., Williams, R. C., Pierson, M. D., Popham, D. L. & Kniel, K. E. (2007).** Influence of curli expression by *Escherichia coli* 0157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. *J Food Prot* **70**, 1339-1345.
- Branda, S. S., Vik, S., Friedman, L. & Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**, 20-26.
- Brooun, A., Liu, S. & Lewis, K. (2000).** A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 640-646.
- Bruneel, O., Personne, J. C., Casiot, C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F., Mahler, B. J., Le Fleche, A. & Grimont, P. A. (2003).** Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoulès, France). *J Appl Microbiol* **95**, 492-499.
- Bryan, C. G., Marchal, M., Battaglia-Brunet, F., Kugler, V., Lemaitre-Guillier, C., Lièvremont, D., Bertin, P. N. & Arsène-Piolet, F. (2009).** Carbon and arsenic metabolism in *Thiomonas* strains: differences revealed diverse adaptation processes. *BMC Microbiol* **9**, 127.
- Buhr, N., Carapito, C., Schaeffer, C., Hovasse, A., Van Dorsselaer, A. & Viville, S. (2007).** Proteome analysis of the culture environment supporting undifferentiated mouse embryonic stem and germ cell growth. *Electrophoresis* **28**, 1615-1623.

- Carapito, C., Muller, D., Turlin, E., Koechler, S., Danchin, A., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., Bertin, P. N. & Lett, M. C. (2006).** Identification of genes and proteins involved in the pleiotropic response to arsenic stress in *Caenibacter arsenoxydans*, a metalloresistant beta-proteobacterium with an unsequenced genome. *Biochimie* **88**, 595-606.
- Carpentier, B. & Cerf, O. (1993).** Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* **75**, 499-511.
- Chai, Y., Chu, F., Kolter, R. & Losick, R. (2008).** Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **67**, 254-263.
- Chang, W. S., Li, X. & Halverson, L. J. (2009).** Influence of water limitation on endogenous oxidative stress and cell death within unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* **11**, 1482-1492.
- Choi, Y. C. & Morgenroth, E. (2003).** Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Sci Technol* **47**, 69-76.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M. G., Folcher, M., Jeno, P., Grzesiek, S. & Jenal, U. (2007).** DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4112-4117.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711-745.
- Cox, M. M. (2007).** Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 41-63.
- Da Re, S., Le Quere, B., Ghigo, J. M. & Beloin, C. (2007).** Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3391-3403.
- Danese, P. N., Pratt, L. A. & Kolter, R. (2000).** Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**, 3593-3596.
- Das, T., Sharma, P. K., Busscher, H. J., van der Mei, H. C. & Krom, B. P. (2010).** Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3405-3408.
- Davey, M. E. & O'Toole G, A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 847-867.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglesias, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.
- Davies, D. G. & Marques, C. N. (2009).** A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* **191**, 1393-1403.
- Dhar, N. & McKinney, J. D. (2007).** Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr Opin Microbiol* **10**, 30-38.

- Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S. & Van Houdt, R. (2009).** From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**, 247-258.
- Donlan, R. M. (2002).** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881-890.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193.
- Drenkard, E. & Ausubel, F. M. (2002).** *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**, 740-743.
- Drenkard, E. (2003).** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**, 1213-1219.
- Dubnau, D. & Losick, R. (2006).** Bistability in bacteria. *Mol Microbiol* **61**, 564-572.
- Dunny, G. M., Brickman, T. J. & Dworkin, M. (2008).** Multicellular behavior in bacteria: communication, cooperation, competition and cheating. *Bioessays* **30**, 296-298.
- Dupraz, C. & Visscher, P. T. (2005).** Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends Microbiol* **13**, 429-438.
- Duquesne, K., Lieutaud, A., Ratouchniak, J., Muller, D., Lett, M. C. & Bonnefoy, V. (2008).** Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ Microbiol* **10**, 228-237.
- Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. & Swain, P. S. (2002).** Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**, 1183-1186.
- Engelberg-Kulka, H., Amitai, S., Kolodkin-Gal, I. & Hazan, R. (2006).** Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS Genet* **2**, e135.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2001).** Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* **43**, 9-16.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010).** The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623-633.
- Gebel, T. W. (2002).** Arsenic methylation is a process of detoxification through accelerated excretion. *Int J Hyg Environ Health* **205**, 505-508.
- Gerdes, K., Christensen, S. K. & Lobner-Olesen, A. (2005).** Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* **3**, 371-382.
- Ghigo, J. M. (2001).** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2005).** Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* **7**, 894-906.
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L. & Tolker-Nielsen, T. (2009).** Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol*.

- Goller, C. C. & Romeo, T. (2008).** Environmental influences on biofilm development. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 37-66.
- Goulter, R. M., Gentle, I. R. & Dykes, G. A. (2009).** Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Lett Appl Microbiol* **49**, 1-7.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S. & Baudu, M. (2005).** Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* **59**, 629-638.
- Guibaud, G., van Hullebusch, E. & Bordas, F. (2006).** Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge tests and mathematical equilibrium modelling. *Chemosphere* **64**, 1955-1962.
- Hallberg, K. B. & Johnson, D. B. (2003).** Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy* **71**, 139-148.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knochel, S. & Molin, S. (2010).** Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2271-2279.
- Harrison, J. J., Turner, R. J. & Ceri, H. (2005).** Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **7**, 981-994.
- Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, R. J. (2007).** Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* **5**, 928-938.
- Harshey, R. M. & Matsuyama, T. (1994).** Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8631-8635.
- Harshey, R. M. (2003).** Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**, 249-273.
- Hausner, M. & Wuertz, S. (1999).** High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3710-3713.
- Hengge, R. (2009).** Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263-273.
- Henke, J. M. & Bassler, B. L. (2004).** Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* **14**, 648-656.
- Hickman, J. W., Tifrea, D. F. & Harwood, C. S. (2005).** A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14422-14427.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. & Miller, S. I. (2005).** Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171-1175.
- Hunt, S. M., Werner, E. M., Huang, B., Hamilton, M. A. & Stewart, P. S. (2004).** Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7418-7425.

- Imlay, J. A. (2003).** Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**, 395-418.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. & Kaplan, J. B. (2008).** Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**, 470-476.
- Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E. & Romeo, T. (2002).** Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 290-301.
- Jarrell, K. F. & McBride, M. J. (2008).** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**, 466-476.
- Johnson, D. B. & Hallberg, K. B. (2003).** The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* **154**, 466-473.
- Johnson, D. B. & Hallberg, K. B. (2005).** Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Sci Total Environ* **338**, 81-93.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U. & Melefors, Ö. (2010).** Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environmenal Microbiology* **12**, 524-540.
- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W. & Crook, D. W. (2009).** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 376-393.
- Kaplan, J. B., Velliagounder, K., Ragunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J. K. & Ramasubbu, N. (2004).** Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **186**, 8213-8220.
- Karamanov, D. G. & Nikolov, L. N. (1988).** Influence of some physicochemical parameters on bacterial activity of biofilm: Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol Bioeng* **31**, 295-299.
- Karatan, E. & Watnick, P. (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310-347.
- Kato, J., Kim, H. E., Takiguchi, N., Kuroda, A. & Ohtake, H. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *J Biosci Bioeng* **106**, 1-7.
- Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. (2004).** Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 8172-8180.
- Kirisits, M. J., Prost, L., Starkey, M. & Parsek, M. R. (2005).** Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4809-4821.
- Kirisits, M. J. & Parsek, M. R. (2006).** Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell Microbiol* **8**, 1841-1849.

- Kirov, S. M., Castrisos, M. & Shaw, J. G. (2004).** *Aeromonas flagella* (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect Immun* **72**, 1939-1945.
- Kirov, S. M., Webb, J. S., O'May C, Y., Reid, D. W., Woo, J. K., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2007).** Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**, 3264-3274.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**, 1511-1524.
- Koechler, S., Cleiss-Arnold, J., Proux, C. & other authors (2010).** Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *BMC Microbiol* **10**, 53.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. & Losick, R. (2010).** D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**, 627-629.
- Kolter, R. & Greenberg, E. P. (2006).** Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* **441**, 300-302.
- Kumar, P. R., Chaudhari, S., Khilar, K. C. & Mahajan, S. P. (2004).** Removal of arsenic from water by electrocoagulation. *Chemosphere* **55**, 1245-1252.
- Kur, J., Olszewski, M., Dlugolecka, A. & Filipkowski, P. (2005).** Single-stranded DNA-binding proteins (SSBs) -- sources and applications in molecular biology. *Acta Biochim Pol* **52**, 569-574.
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G. & Nijland, R. (2010).** Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 813-823.
- Lee, S. F., Li, Y. H. & Bowden, G. H. (1996).** Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* **64**, 1035-1038.
- Lemon, K. P., Higgins, D. E. & Kolter, R. (2007).** Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol* **189**, 4418-4424.
- Lewis, K. (2001).** Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 999-1007.
- Lièvremont, D., Bertin, P. N. & Lett, M. C. (2009).** Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie* **91**, 1229-1237.
- Liu, S. X., Davidson, M. M., Tang, X., Walker, W. F., Athar, M., Ivanov, V. & Hei, T. K. (2005).** Mitochondrial damage mediates genotoxicity of arsenic in mammalian cells. *Cancer Res* **65**, 3236-3242.
- Liu, X., Ng, C. & Ferenci, T. (2000).** Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J Bacteriol* **182**, 4158-4164.
- London, J. & Rittenberg, S. C. (1967).** *Thiobacillus perometabolis* nov. sp., a non-autotrophic thiobacillus. *Arch Mikrobiol* **59**, 218-225.
- Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R. & Kolter, R. (2009).** Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **74**, 609-618.

- Lu, T., Shen, T., Bennett, M. R., Wolynes, P. G. & Hasty, J. (2007).** Phenotypic variability of growing cellular populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18982-18987.
- Macia, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J. L. & Oliver, A. (2005).** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3382-3386.
- Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**, 34-39.
- Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J. S. & Kjelleberg, S. (2004).** Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3232-3238.
- Mai-Prochnow, A., Webb, J. S., Ferrari, B. C. & Kjelleberg, S. (2006).** Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5414-5420.
- Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J. S., Sanchez-Amat, A. & Kjelleberg, S. (2008).** Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **190**, 5493-5501.
- Maira-Litran, T., Allison, D. G. & Gilbert, P. (2000).** Expression of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J Appl Microbiol* **88**, 243-247.
- Mandal, B. K. & Suzuki, K. T. (2002).** Arsenic round the world: a review. *Talanta* **58**, 201-235.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R. & other authors (2009).** Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* **4**, e5822.
- Matschullat, J. (2000).** Arsenic in the geosphere - A review. *Science of the Total Environment* **249**, 297-312.
- Mattick, J. S. (2002).** Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289-314.
- May, T. & Okabe, S. (2008).** *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and curli. *J Bacteriol* **190**, 7479-7490.
- McCann, K. S. (2000).** The diversity-stability debate. *Nature* **405**, 228-233.
- Meister, M., Lowe, G. & Berg, H. C. (1987).** The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell* **49**, 643-650.
- Morales, D. K., Ocampo, W. & Zambrano, M. M. (2007).** Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. *J Appl Microbiol* **103**, 2704-2712.
- Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S. H., Hassett, D. J. & Sauer, K. (2006).** BdIA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 7335-7343.

- Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T. & Silver, S. (2002).** Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 311-325.
- Muller, D., Medigue, C., Koechler, S. & other authors (2007).** A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet* **3**, e53.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B. & Foster, K. R. (2009).** The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 206-224.
- Neu, T. R. (1996).** Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol Rev* **60**, 151-166.
- O'day, P. (2006).** Chemistry and mineralogy of arsenic. *Elements* **2**, 77-83.
- O'Neil, H. S. & Marquis, H. (2006).** *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion. *Infect Immun* **74**, 6675-6681.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998a).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**, 449-461.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998b).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. & Blazquez, J. (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**, 1251-1254.
- Oremland, R. S. & Stolz, J. F. (2003).** The ecology of arsenic. *Science* **300**, 939-944.
- Otto, K., Elwing, H. & Hermansson, M. (1999).** The role of type 1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B* **15**, 99-111.
- Otto, K. & Hermansson, M. (2004).** Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J Bacteriol* **186**, 226-234.
- Paez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V. & Canovas, D. (2009).** Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* **22**, 117-130.
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K. & Tolker-Nielsen, T. (2008).** Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol* **68**, 223-240.
- Pamp, S. J., Sternberg, C. & Tolker-Nielsen, T. (2009).** Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* **75**, 90-103.
- Park, D., Lee, D. S. & Park, J. M. (2005).** Continuous biological ferrous iron oxidation in a submerged membrane bioreactor. *Water Sci Technol* **51**, 59-68.

- Park, S., Wolanin, P. M., Yuzbashyan, E. A., Silberzan, P., Stock, J. B. & Austin, R. H. (2003).** Motion to form a quorum. *Science* **301**, 188.
- Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 27-33.
- Pelicic, V. (2008).** Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**, 827-837.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehlis, A. & Hengge, R. (2008).** Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**, 2434-2446.
- Petrick, J. S., Ayala-Fierro, F., Cullen, W. R., Carter, D. E. & Vasken Aposhian, H. (2000).** Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **163**, 203-207.
- Pollock, T. J., van Workum, W. A., Thorne, L., Mikolajczak, M. J., Yamazaki, M., Kijne, J. W. & Armentrout, R. W. (1998).** Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in *Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **180**, 586-593.
- Ponder, R. G., Fonville, N. C. & Rosenberg, S. M. (2005).** A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation. *Mol Cell* **19**, 791-804.
- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler, A. D. & Camilli, A. (2007).** PilZ domain proteins bind cyclic di-guanosine monophosphate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **282**, 12860-12870.
- Pratt, J. T., McDonough, E. & Camilli, A. (2009).** PhoB regulates motility, biofilms, and cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **191**, 6632-6642.
- Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293.
- Pruss, B. M., Besemann, C., Denton, A. & Wolfe, A. J. (2006).** A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 3731-3739.
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W. J. & Stoodley, P. (2005).** Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology* **151**, 1569-1576.
- Raser, J. M. & O'Shea, E. K. (2005).** Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* **309**, 2010-2013.
- Ratto, M., Verhoef, R., Suihko, M. L., Blanco, A., Schols, H. A., Voragen, A. G., Wilting, R., Siika-Aho, M. & Buchert, J. (2006).** Colanic acid is an exopolysaccharide common to many enterobacteria isolated from paper-machine slimes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 359-367.
- Retsema, J. A., Brennan, L. A. & Girard, A. E. (1991).** Effects of environmental factors on the in vitro potency of azithromycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**, 834-842.

- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S. & Bayles, K. W. (2007).** The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8113-8118.
- Rice, S. A., Tan, C. H., Mikkelsen, P. J. & other authors (2009).** The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J* **3**, 271-282.
- Roberts, A. P., Mullany, P. & Wilson, M. (2001).** Gene transfer in bacterial biofilms. *Methods Enzymol* **336**, 60-65.
- Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D. J. (2007).** Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* **10**, 644-648.
- Sakuragi, Y. & Kolter, R. (2007).** Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 5383-5386.
- Santini, J. M., Sly, L. I., Schnabl, R. D. & Macy, J. M. (2000).** A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol* **66**, 92-97.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**, 1140-1154.
- Schooling, S. R. & Beveridge, T. J. (2006).** Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**, 5945-5957.
- Schooling, S. R., Hubley, A. & Beveridge, T. J. (2009).** Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **191**, 4097-4102.
- Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K. & Lewis, K. (2006).** Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* **6**, 53.
- Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H. & Usui, T. (1997).** Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* **43**, 340-345.
- Shokri, L., Rouzina, I. & Williams, M. C. (2009).** Interaction of bacteriophage T4 and T7 single-stranded DNA-binding proteins with DNA. *Phys Biol* **6**, 025002.
- Shunmugaperumal, T. (2010).** Microbial colonization of medical devices and novel preventive strategies. *Recent Pat Drug Deliv Formul* **4**, 153-173.
- Silver, S. & Phung, L. T. (2005).** Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* **71**, 599-608.
- Singh, R., Paul, D. & Jain, R. K. (2006).** Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol* **14**, 389-397.
- Smedley, P. L., Zhang, M., Zhang, G. & Luo, Z. (2001).** Arsenic and other redox-sensitive elements in groundwater from the Huhhot Basin, Inner Mongolia. *Water-Rock Interaction, Vols 1 and 2*, 581-584 1607.

- Smith, A. H., Lingas, E. O. & Rahman, M. (2000).** Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bull World Health Organ* **78**, 1093-1103.
- Sorensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N. & Wuertz, S. (2005).** Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nat Rev Microbiol* **3**, 700-710.
- Spoering, A. L. & Lewis, K. (2001).** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* **183**, 6746-6751.
- Stewart, P. S. (1998).** A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol Bioeng* **59**, 261-272.
- Stewart, P. S. (2002).** Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* **292**, 107-113.
- Stewart, P. S. & Franklin, M. J. (2008).** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199-210.
- Stolz, J. F., Basu, P., Santini, J. M. & Oremland, R. S. (2006).** Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol* **60**, 107-130.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D. & Lappin-Scott, H. M. (1999).** Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an *in situ* investigation of biofilm rheology. *Biotechnol Bioeng* **65**, 83-92.
- Stoodley, P., Jacobsen, A., Dunsmore, B. C., Purevdorj, B., Wilson, S., Lappin-Scott, H. M. & Costerton, J. W. (2001).** The influence of fluid shear and AlCl<sub>3</sub> on the material properties of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Desulfovibrio* sp. EX265 biofilms. *Water Sci Technol* **43**, 113-120.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **53**, 187-209.
- Strevett, K. A. & Chen, G. (2003).** Microbial surface thermodynamics and applications. *Res Microbiol* **154**, 329-335.
- Styblo, M., Del Razo, L. M., Vega, L. & other authors (2000).** Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Arch Toxicol* **74**, 289-299.
- Sullivan, C., Tyrer, M., Cheeseman, C. R. & Graham, N. J. (2010).** Disposal of water treatment wastes containing arsenic - a review. *Sci Total Environ* **408**, 1770-1778.
- Tack, K. J. & Sabath, L. D. (1985).** Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiosis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Cancer Chemotherapy* **31**, 204-210.
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J. & Hancock, L. E. (2009).** A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **72**, 1022-1036.
- Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S. & Spormann, A. M. (2005).** Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol* **187**, 1014-1021.

- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S. & Molin, S. (2000).** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* **182**, 6482-6489.
- Tolker-Nielsen, T. & Molin, S. (2000).** Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol* **40**, 75-84.
- Vahter, M. (2002).** Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* **181-182**, 211-217.
- van der Mei, H. C., Bos, R. & Busscher, H. J. (1998).** A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B* **11**, 213-221.
- Vatanyoopsisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E., Rees, C. E. & Waites, W. M. (2000).** Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl Environ Microbiol* **66**, 860-863.
- Veening, J. W., Smits, W. K. & Kuipers, O. P. (2008).** Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **62**, 193-210.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debekumari, B., Fauvert, M., Fransaer, J., Vermant, J. & Michiels, J. (2008).** Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **16**, 496-506.
- Wahlquist, B. & Pickett, T. (2003).** Effective biological water treatment through biological process control. *Tailings and Mine Waste '03*, 413-418  
526.
- Walters, M. C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. (2003).** Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 317-323.
- Wang, Q., Frye, J. G., McClelland, M. & Harshey, R. M. (2004).** Gene expression patterns during swarming in *Salmonella* Typhimurium: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol Microbiol* **52**, 169-187.
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. & Kjelleberg, S. (2003).** Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**, 4585-4592.
- Webb, J. S., Lau, M. & Kjelleberg, S. (2004).** Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**, 8066-8073.
- Weiss, S., Carapito, C., Cleiss, J. & other authors (2009).** Enhanced structural and functional genome elucidation of the arsenite-oxidizing strain *Herminiimonas arsenicoxydans* by proteomics data. *Biochimie* **91**, 192-203.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. & Greenberg, E. P. (2001).** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860-864.

- Wilson, W. W., Wade, M. M., Holman, S. C. & Champlin, F. R. (2001).** Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J Microbiol Methods* **43**, 153-164.
- Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. (2000).** Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 661-671.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. & McFeters, G. A. (1998).** Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4035-4039.
- Xu, K. D., Franklin, M. J., Park, C. H., McFeters, G. A. & Stewart, P. S. (2001).** Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 67-71.
- Zobell, C. (1943).** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* **46**, 39-56.
- Zouboulis, A. I. & Katsoyiannis, I. A. (2005).** Recent advances in the bioremediation of arsenic-contaminated groundwaters. *Environment International* **31**, 213-219.