



HAL
open science

Développement d'un biocapteur bactérien pour la détection de métaux lourds

Karl Bernhard Riether

► **To cite this version:**

Karl Bernhard Riether. Développement d'un biocapteur bactérien pour la détection de métaux lourds. Biodiversité et Ecologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2001. Français. NNT : 2001METZ019S . tel-01748961

HAL Id: tel-01748961

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748961v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Metz

Laboratoire Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale

Equipe de Microbiologie

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de **Docteur** par

Karl Bernhard RIETHER

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20010565
Cote	S/M z 01/19
Loc	Magasin

Discipline : Biologie, Biotechnologie Environnementale

Développement d'un biocapteur bactérien pour la détection de métaux lourds

Présentée et soutenue publiquement le 12 juillet 2001, devant le jury composé de :

Mlle P. VASSEUR	(Président)
M. R. D'ARI	(Rapporteur)
M. C. GEORGOPOULOS	(Rapporteur)
M. M.S. DUBOW	(Directeur de thèse)
M. P. BILLARD	(Codirecteur de thèse)

Université de Metz

Laboratoire Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale

Equipe de Microbiologie

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de **Docteur** par

Karl Bernhard RIETHER

Discipline : Biologie, Biotechnologie Environnementale

<p>Développement d'un biocapteur bactérien pour la détection de métaux lourds</p>
--

Présentée et soutenue publiquement le 12 juillet 2001, devant le jury composé de :

Mlle P. VASSEUR	(Président)
M. R. D'ARI	(Rapporteur)
M. C. GEORGOPOULOS	(Rapporteur)
M. M.S. DUBOW	(Directeur de thèse)
M. P. BILLARD	(Codirecteur de thèse)

Pour mes amis / meinen Freunden

A Marie-Hélène

REMERCIEMENTS

Ce travail a débuté au sein du laboratoire de Microbiologie, qui était dirigé par Monsieur le Professeur Michael S. DuBow, à qui j'adresse mes remerciements pour m'avoir accueilli dans son équipe et confié ce sujet intéressant

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Patrick Billard, Maître de Conférences et co-encadrant de thèse, qui m'a initié avec patience aux techniques de la microbiologie et de la biologie moléculaire, et qui a suivi et dirigé mon travail. Je le remercie sincèrement pour sa disponibilité et ses conseils qui ont été déterminants pour l'aboutissement de cette thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Mademoiselle le Professeur Paule Vasseur, pour m'avoir encouragé à mener à terme cette thèse et pour avoir bien voulu faire partie du jury.

Je suis également très reconnaissant au Docteur Richard D'Ari, directeur de recherches au CNRS, et à Monsieur le Professeur Costa Georgopoulos d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteurs. J'ai apprécié les remarques et les discussions que nous avons eues au cours de la soutenance.

Je remercie particulièrement les membres de l'équipe de Microbiologie qui ont contribué considérablement à ce travail. Merci à Marie-Andrée pour son aide lors de mes manips, qui a permis de mener à terme ce travail. Un grand merci à Magalie et Pascal, de m'avoir soutenu activement et encouragé moralement. Mes remerciements s'adressent également à Philippe, Anne-Marie et Pierre qui ont participé à l'avancement de ma thèse.

Enfin, je remercie les membres de l'EBSE, anciennement CSE, pour l'accueil dans le laboratoire et pour les nombreuses discussions enrichissantes.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Table des matières.....	4
Abréviations.....	7
Introduction générale	8
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
<hr/>	
I. Les métaux lourds dans l'environnement	11
I.1. Origine et distribution des métaux lourds	11
I.2. La biodisponibilité des métaux lourds	13
I.2.1. Influence du pH	14
I.2.2. Influence du potentiel redox E_h	14
I.2.3. Influence des anions	15
I.2.4. Influence des argiles.....	16
I.2.5. Influence de la matière organique	17
I.3. La résistance des microorganismes aux métaux lourds.....	17
I.3.1. Fonctionnement des ATPases de type CPx.....	21
I.3.1.1. Caractéristiques structurales.....	21
I.3.1.2. Régulation de l'expression : cas du gène <i>zntA</i>	22
II. Les biocapteurs.....	24
II.1 Le principe du biocapteur	24
II.2 Les biocapteurs bactériens	25
II.3. Construction de biocapteurs bactériens.....	27
II.3.1. La fusion transcriptionnelle	27
II.3.2. Les gènes rapporteurs.....	27
II.3.3. Les constructions avec vecteurs de clonage et transposons.....	32
II.4. Applications environnementales des biocapteurs bactériens	34
III. Objectifs du projet de thèse	37
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	38
<hr/>	
I. Souches, Plasmides, Phages	38
II. Composés chimiques, milieux et conditions de culture	39
III. Construction de la banque de fusions transcriptionnelles	40
III.1. Préparation du lysat phagique.....	41
III.2. Infection.....	41
III.3. Criblage de la banque	41
IV. Techniques de biologie moléculaire.....	42
IV.1. Extraction d'ADN	42
IV.1.1. Extraction d'ADN chromosomique.....	42
IV.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique	43
IV.1.3. Purification d'un fragment d'ADN	43
IV.2. Modifications enzymatiques de l'ADN.....	43
IV.2.1. Digestion par les endonucléases de restriction.....	43

IV.2.2. Ligation de l'ADN.....	44
IV.3. Analyse de l'ADN	44
IV.3.1. Electrophorèse en gel d'agarose.....	44
IV.3.2 Quantification de l'ADN	45
IV.4. Analyse de l'ADN par hybridation (Southern Blot).....	45
IV.4.1. Transfert d'ADN sur membrane de nylon.....	45
IV.4.2. Marquage, hybridation et détection.....	46
IV.4.2.1. Marquage de la sonde d'ADN.....	46
IV.4.2.2. Hybridation ADN/ADN	46
IV.4.2.3. Révélation.....	47
IV.5. Amplification <i>in vitro</i> de fragments d'ADN (PCR).....	48
IV.6. Séquençage de l'ADN	49
IV.7. Transformation bactérienne et sélection des recombinants.....	49
IV.7.1. Transformation après traitement au CaCl ₂	49
IV.7.2. Electroporation	50
V. Dosage de l'activité β-galactosidase.....	51
V.1. Dosage sur boîte de Pétri	52
V.2. Cinétique en milieu liquide.....	52
VI. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).52	
VII. Mesures de luminométrie	53
VII.1. Généralités.....	53
VII.2. Préparation des cultures pour le bioessai	53
VII.2.1. Les mesures dans du milieu LB	53
VII.2.2. Les mesures dans du milieu MN.....	54
VII.2.2.1. Par centrifugation.....	54
VII.2.2.2. Par dilution.....	54
VII.2.3. Les mesures dans du milieu GGM.....	55
VII.2.3.1. Mesures préliminaires	55
VII.2.3.2. Protocole standard.....	55
VII.2.3.3. Mesure de l'influence de la phase de croissance	55
VII.2.3.4. Mesure de l'influence de la densité cellulaire.....	56
VII.2.3.5. Mesure de l'influence du pH.....	56
VII.2.3.6. Mesure de la luminescence en présence de plusieurs métaux... 56	
VII.2.3.7. Mesure de la luminescence en présence de chélateurs.....	56
VII.2.3.8. Analyse d'échantillons environnementaux	57
VIII. Préparation des échantillons environnementaux	57
VIII.1. Préparation et conditionnement des sols.....	57
VIII.2. Préparation des lixiviats.....	58
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	59
I. Isolement d'un clone répondant au mercure	59
I.1. Criblage de la banque de fusions transcriptionnelles	59
I.2. Caractérisation de la réponse du clone HG7 au mercure	60
I.3. Analyse de la fusion <i>x::lacZ</i> dans <i>E. coli</i> HG7	62
I.3.1 Analyse par Southern Blot	62

I.3.2. Clonage de la fusion du génome de HG7.....	64
I.3.3. Analyse de la séquence de pHG18.....	67
I.4. Caractérisation de <i>zntA</i>	68
I.4.1. Expression de <i>zntA</i> en présence de métaux lourds.....	69
I.4.2. Influence de <i>zntA</i> sur la résistance aux métaux lourds.....	70
I.4.3. Induction de <i>zntA</i> sur le plasmide pHG18.....	71
I.5. Discussion.....	73
II. Développement d'une souche rapporteur luminescente et mise en œuvre d'un test pour la détection de métaux lourds	77
II.1. Construction de la fusion <i>zntA::lux</i>	77
II.1.1. Clonage du promoteur <i>PzntA</i>	77
II.1.2. Isolement du plasmide rapporteur <i>pZNT::lux</i>	80
II.2. Mesures préliminaires.....	81
II.3. Etude de la réponse et standardisation du test.....	83
II.3.1. Influence de la souche bactérienne.....	84
II.3.2 Influence du milieu de culture.....	85
II.3.3. Influence de la phase de croissance.....	90
II.3.4 Influence de la densité cellulaire.....	93
II.3.5 Influence de l'acidité du milieu.....	95
II.4 Mesure après le processus de standardisation.....	96
II.5. Discussion.....	99
III. Applications du biocapteur comme outil d'analyse	105
III.1. Induction en présence de plusieurs métaux.....	105
III.2. L'influence des substances chélateurs.....	107
III.3. Application à des échantillons environnementaux.....	110
III.4. Discussion.....	115
Conclusion générale et perspectives	122
I. Conclusions.....	122
I.1. Identification de <i>zntA</i>	122
I.2. Elaboration d'un biocapteur bactérien aux métaux lourds.....	122
I.3. Applications à l'analyse de matrices complexes.....	124
II. Perspectives.....	125
II.1. Reproductibilité de l'essai de bioluminescence.....	125
II.2. Spécificité pour les métaux lourds.....	126
Références bibliographiques	128
Listes des figures et tableaux	142
Annexe : Analyses des sols.....	144
Annexe : Article.....	145
Résumé	152
Abstract.....	153

ABREVIATIONS

AAS	Spectroscopie à Adsorption Atomique
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BEt	Bromure d'éthidium
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
h	heure(s)
DIG	Digoxygénine
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GFP	Green fluorescent protein
GGM	Glucose-Glycérophosphate Medium
GIGM	Glycérol-Glycérophosphate Medium
HPLC	Chromatographie à haute performance
kb	kilobases
LB	Milieu Luria Bertani
LBG	Milieu Luria Bertani supplémenté de glycérol (0,3%)
M	Métal
MN	Milieu Mops - Sodium
min	minute(s)
MS	Spectroscopie de masse
ONPG	ortho-nitrophénol- β -D-galactopyranoside
ORF	Cadre de lecture ouverte
pb	Pair de bases
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
ppm	partie par million
s	secondes
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SSC	Solution saline de citrate de sodium
TAE	Tampon Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM
TBE	Tampon Tris-borate 45 mM, EDTA 1mM
TE	Tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM
Tris	Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

INTRODUCTION GENERALE

Les métaux existent à l'état naturel, à des concentrations variables, dans l'écorce terrestre. Ainsi, les métaux lourds sont omniprésents dans l'environnement où ils se trouvent sous des formes ioniques, en composés ou en complexes, qui sont généralement inoffensives pour les organismes vivants. Ils sont souvent immobilisés dans des compartiments inaccessibles aux organismes, mais des perturbations des activités biogéochimiques naturelles par l'Homme peuvent résulter en une pollution métallique. En effet, les métaux lourds sont extraits, purifiés et transformés pour une utilisation industrielle, et ils sont ensuite relâchés dans l'environnement sous des formes souvent disponibles aux organismes. La distribution et conversion globale a pour conséquence l'exposition des organismes vivants à des métaux lourds.

Une concentration insuffisante ou trop élevée d'un métal donné sous sa forme biodisponible peut nuire aux écosystèmes et à la santé des êtres vivants. En effet, certains métaux font partie des éléments traces essentiels et sont, en faibles quantités, indispensables au développement des organismes. En revanche, d'autres métaux n'ont pas de fonction biologique connue et sont directement toxiques pour les organismes (tableau 1). De plus, les métaux essentiels peuvent également être toxiques à des concentrations élevées.

Li	Be											B	C	N	O
Na	Mg											<i>Al</i>	Si	P	S
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	<i>As</i>	Se
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	<i>Ag</i>	<i>Cd</i>	In	<i>Sn</i>	<i>Sb</i>	<i>Te</i>
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	<i>Os</i>	Ir	Pt	Au	<i>Hg</i>	Tl	<i>Pb</i>	Bi	Po

Tableau 1 : Tableau périodique des éléments avec les métaux et métalloïdes importants pour les organismes (d'après Hughes et Poole, 1991).

Les métaux et métalloïdes essentiels sont présentés en gras ; les métaux et métalloïdes toxiques connus sont en italique. Les groupes des gaz rares et des halogènes, les lanthanides et les périodes I et VII sont omis.

Selon le métal considéré, sa toxicité s'exerce de différentes manières : par remplacement de métaux essentiels, par blocage des groupements fonctionnels ou par interaction avec des macromolécules biologiques telles que les enzymes, les acides nucléiques ou les membranes (Collins et Stotzky, 1989). Ainsi, l'ensemble des êtres vivants

peut être touché par le relargage excessif des métaux lourds dans l'environnement (Hapke, 1991).

Le problème principal posé par les métaux lourds dans l'environnement est leur persistance. En effet, contrairement aux composés organiques, ils ne peuvent pas être dégradés, que ce soit par voie biologique ou par voie physico-chimique. Bien que la nature chimique des métaux puisse être modifiée par oxydation ou réduction, leur nature élémentaire reste la même et exclut toute possibilité de décomposition thermique ou de dégradation microbiologique. Par conséquent, ils ont tendance à s'accumuler dans les sols ou les sédiments, où ils peuvent développer une chimie très complexe en raison des influences abiotiques (pH, matière organique, potentiel redox) et biotiques (activité microbienne, racine des plantes) du milieu (White *et al.*, 1997). En effet, ils peuvent être adsorbés et désorbés, modifiés dans leur forme chimique et dans leur spéciation, complexés avec des ligands divers, précipités et redissous. Une des conséquences de l'accumulation, de la persistance et du comportement des métaux dans l'environnement, est que des procédés complexes doivent être mis en place pour restaurer les sites contaminés (Stratton, 1987).

Afin de limiter l'exposition de la population humaine aux métaux lourds, il est nécessaire, d'une part de développer des industries moins polluantes et, parallèlement, d'identifier les sites pollués. Ainsi, un système de surveillance a été développé en France pour rechercher les sites pollués et observer les rejets des installations industrielles classées (Circulaires ministériels du 03/12/1993 et du 03/04/1996).

En général, cette surveillance de qualité s'appuie sur des méthodes physico-chimiques, telles que la spectroscopie à absorption atomique (AAS), la spectroscopie de masse (MS), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou encore la chromatographie en phase gazeuse (GC). L'atout majeur de ces techniques est leur haut degré de spécificité, de sélectivité et de sensibilité. Mais une analyse par des méthodes physico-chimiques exige un appareillage coûteux, ainsi qu'un procédé de préparation et de mesure *ex-situ* qui est long à réaliser. De plus, ce type d'analyse ne permet d'évaluer que la quantité totale et la spéciation d'un polluant particulier, et ne donne que peu d'informations sur sa biodisponibilité ou sa toxicité potentielle. Pour une évaluation du risque et une analyse de qualité environnementale significative, il est donc nécessaire de connaître ce paramètre de biodisponibilité.

Le développement d'un système de détection et de quantification des métaux lourds, bon marché, fiable, utilisable sur le terrain et qui donnerait des informations sur le niveau de

contamination d'un site, constituerait donc un apport précieux dans ce domaine. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs tests biologiques ont été développés pour évaluer la toxicité et/ou la biodisponibilité de différents composés. Ces biotests ou bioessais utilisent des organismes très variés tels que des bactéries, des daphnies, des moules ou encore la truite (Keddy *et al.*, 1995). Ces approches permettent, de façon efficace, la détermination de la concentration biodisponible en composés toxiques, mais une distinction spécifique des contaminants s'avère difficile.

Pour combiner les avantages des tests biologiques avec la spécificité et la sensibilité d'une analyse physico-chimique, les efforts de la recherche en biotechnologie se sont ciblés sur le développement de biocapteurs bactériens. Il s'agit d'organismes vivants modifiés génétiquement couplés à un système de transduction de signal permettant la détection des quantités biodisponibles d'un polluant spécifique. Les biocapteurs sont construits de sorte que l'organisme puisse capter un stress environnemental et le traduire en un signal facilement mesurable (Van der Lelie *et al.*, 1994). Leur intérêt principal est qu'ils permettent d'évaluer la biodisponibilité du polluant, avec une grande spécificité (Heitzer *et al.*, 1992 ; Billard et DuBow, 1998), données essentielles pour une analyse environnementale et pour la mise en place de techniques de bioredressement.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les métaux lourds dans l'environnement

Dans ce premier paragraphe, nous verrons que les métaux présents dans l'environnement ont des origines anthropiques et naturelles. Bien qu'ils soient largement répandus dans l'environnement, les métaux lourds existent généralement sous une forme inoffensive pour les organismes vivants. En effet, la forme chimique d'un métal conditionne sa disponibilité et donc sa toxicité vis-à-vis des organismes. Ainsi, nous détaillerons dans un deuxième temps les facteurs principaux influençant leur biodisponibilité. Lorsqu'ils sont biodisponibles, certains métaux sont toxiques pour les organismes. Ces derniers ont développé des mécanismes de résistance que nous décrirons dans une troisième partie.

I.1. Origine et distribution des métaux lourds

L'émission de métaux lourds dans l'environnement est d'origine naturelle et anthropique. Les sources naturelles atmosphériques consistent en une émission de particules due aux activités volcaniques, aux feux de forêts ou aux particules du sol emportées par le vent (Nriagu, 1989). Pour la plupart des métaux toxiques, le flux naturel est infime comparé aux émissions industrielles (tableau 2). Notons cependant que les émissions atmosphériques de plomb ont diminué récemment grâce au remplacement du tétraéthyle de plomb dans les carburants.

Elément	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Se	Zn
Source anthropique	19	7,4	30	35	3,6	38	3,3	56	332	6,3	132
Source naturelle	12	1,3	44	28	2,5	317	3	30	12	9,3	45
Emission totale	31	8,9	74	63	6,1	355	6,3	86	344	16	177

Tableau 2 : Les émissions naturelles et anthropiques d'éléments traces dans l'atmosphère (Unités : $10^3 \text{ kg}\cdot\text{an}^{-1}$) d'après Nriagu (1989).

La plus grande partie des rejets en métaux lourds issus de l'activité humaine se fait dans les eaux (i) et les sols (ii).

(i) La source majeure des éléments traces dans des écosystèmes aquatiques est celle des effluents domestiques (notamment As, Cr, Cu, Mn et Ni), des centrales électriques au charbon (As, Hg et Se), des fonderies de métaux (Cd, Cr, Mo, Ni, Pb, Se et Zn en particulier) et des boues des stations d'épuration (As, Mn et Pb ; tableau 3). Le relargage des métaux toxiques dans les milieux aquatiques entraîne une accumulation de ces éléments dans les sédiments. A ce niveau, ils peuvent être précipités et immobilisés, mais il y a aussi possibilité de mobilisation et de diffusion vers les nappes phréatiques (Förstner et Salomons, 1991). Si l'eau des rivières enrichie en métaux lourds est utilisée pour irriguer les sols d'agriculture, le retour des éléments traces dans l'alimentation est également possible.

Elément	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Se	Zn
Effluents urbains	9,2	1,7	46	28,4	0,6	109,5	2,3	61,5	6,8	3,8	48
Centrales électriques	8,2	0,1	5,7	13,3	1,8	11,4	0,7	10,5	0,7	18	18
Fonderie et sidérurgie	7,38	2	11,8	14,3	0,1	39,9	0,5	13,3	7	12,1	28,8
Industrie de transformation											
-Métallurgie	0,9	1,2	36,5	24	0,4	11,3	2,8	3,9	12,3	2,5	81,5
-Chimie	3,8	1,3	13,3	9,5	0,8	8,5	1,5	3,5	1,7	1,3	2,6
-Autres	2,3	-	0,9	0,5	0,01	0,8	-	0,1	0,5	0,5	0,9
Retombées atmosphériques	5,7	2,3	9,1	10,5	0,6	11,6	1	10,3	100	0,8	39,5
Boues des stations d'épuration	3,6	0,7	18,9	14,5	0,2	69	2,9	10,7	9,5	2	16,8
Total	41	9,4	142	112	4,6	262	11	113	138	41	226

Tableau 3 : Eléments traces d'origine anthropique dans les écosystèmes aquatiques (10^6 kg·an⁻¹) d'après Nriagu et Pacyna (1988).

(ii) L'inventaire réalisé par Nriagu et Pacyna (1988) indique que les sols reçoivent de grandes quantités en métaux toxiques provenant d'une large variété de déchets industriels (tableau 4). Les deux sources principales dans les sols sont les dépôts de cendres de la combustion de charbon et la décharge générale des déchets de produits commerciaux et industriels. Les déchets urbains représentent une source importante de Cu, Hg, Pb et Zn avec des contributions de Cd et de Pb via l'atmosphère. Les larges volumes associés au secteur agroalimentaire peuvent affecter considérablement la teneur en éléments traces dans certains sols, notamment des sols agricoles, sur lesquels ces déchets sont déversés. Les métaux lourds dans les boues des stations d'épuration ne présentent pas globalement de risque, mais dans certains cas, ces boues sont fortement chargées en métaux, de sorte qu'un déversement sur le

sol est problématique ; à l'échelle locale, cela représente parfois la plus importante source de pollution métallique (Nriagu et Pacyna, 1988).

Elément	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Se	Zn
Déchets agricoles et forestiers	7,63	3,5	87,7	96,6	1,9	231	35,6	59,8	36,1	4,9	358
Déchets urbains et boues des stations d'épurations	0,76	4,4	27,8	44	0,58	35,2	2,8	23	54,6	0,5	109
Déchets industriels et commerciaux	34,4	1,2	457	214	0,69	300	3,9	19,3	292,5	0,2	465
Cendres de l'incinération du charbon	21,9	7,3	298	592	2,6	1077	44,5	167,5	143,5	32,1	109
Retombées atmosphériques	13,2	5,3	21,6	25	2,47	26,7	2,3	24	232,5	2	92
Total	82	22	896	971	8,3	1670	88	325	796	41	1372

Tableau 4 : Emissions mondiales d'éléments traces dans les sols ($10^6 \text{ kg}\cdot\text{an}^{-1}$; repris de Nriagu et Pacyna, 1988).

Si les métaux émis étaient dispersés uniformément sur les sols cultivés, dont la surface est évaluée à $16\cdot 10^{12} \text{ m}^2$ (Diamond, 1987), une charge annuelle supplémentaire d'environ $1,0 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ de Cd, de $50 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ de Pb, Cu et Cr, et de $65 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ de Zn et Mn serait déversée. Même si des augmentations comparables ont été mesurées pour certains sols, un grand réservoir en métaux lourds n'est pas encore exploité par l'industrie (Jones *et al.*, 1987).

I.2. La biodisponibilité des métaux lourds

Dans ce paragraphe, nous décrivons les facteurs principaux influençant la biodisponibilité des métaux lourds. De Haan *et al.* (1993) ont défini le terme "biodisponibilité" pour décrire la facilité avec laquelle une substance nutritive ou contaminante peut être absorbée par un système biologique : cela peut être quantifié par l'effet de la substance pour l'organisme. Pour les métaux, on les considère comme étant biodisponible s'ils se trouvent sous forme d'ions libres, et donc généralement solubles et mobiles (Roane et Pepper, 2000). Pourtant, dans l'environnement, la spéciation du métal est affectée par de nombreux facteurs. Comme nous le verrons, ces facteurs sont interdépendants, rendant difficile l'élaboration de postulats.

I.2.1. Influence du pH

Les métaux lourds sont généralement plus solubles et plus mobiles à pH acide qu'à des pH élevés. En milieu acide, ils se trouvent sous forme d'ions libres, alors qu'une augmentation progressive du pH (donc des concentrations en ions hydroxyles) provoque la formation de complexes métalliques hydroxylés dans l'ordre suivant : M^{2+} , MOH^+ , $M(OH)_2$, $M(OH)_3^-$ et $M(OH)_4^{2-}$ (M^{2+} représentant des cations divalents tels que Zn^{2+} , Pb^{2+} et Cd^{2+} , le mercure n'augmentant pas sa coordination au-delà du complexe neutre $Hg(OH)_2$; Hahne et Kroontje, 1973).

La spéciation des métaux peut également changer considérablement avec une augmentation de pH et en présence de certains anions. Par exemple, le carbonate et le sulfate, qui sont omniprésents dans l'environnement, précipitent les métaux lourds à des pH alcalins les rendant ainsi indisponibles aux organismes (Florence, 1977). Par ailleurs, des composés organiques chargés négativement en milieu alcalin peuvent également renforcer la complexation des cations métalliques environnants (Babich et Stotzki, 1979). Enfin, il a été postulé que certains métaux lourds (Cd et Pb) forment des complexes inorganiques plus larges en milieu alcalin ($Pb_6(OH)_8^{4+}$), qui ne peuvent pas aussi facilement être transportés à travers des membranes biologiques que l'ion métallique divalent M^{2+} (Hart et Scaife, 1977).

De manière générale, un milieu acide rend les métaux plus disponibles pour les organismes qu'un milieu alcalin. Cependant, certaines bactéries telles que *Alcaligenes faecalis* ou *Bacillus cereus* présentent une sensibilité accrue vis-à-vis du cadmium pour des valeurs de pH alcalins comprises entre 8 et 9 (Babich et Stotzki, 1980), suggérant ainsi que d'autres facteurs du milieu peuvent modifier la biodisponibilité des métaux lourds.

I.2.2. Influence du potentiel redox E_h

Le potentiel redox (E_h) est une mesure de la disponibilité en électrons dans un milieu. Des valeurs de E_h positives (jusqu'à 700 mV) indiquent un environnement oxydant et des valeurs de E_h négatives (jusqu'à -400 mV) un environnement réducteur. Le potentiel redox est fonction du pH et varie d'environ -59 mV par unité de pH (Schmitt et Sticher 1991).

Certains métaux lourds peuvent exister dans différents états d'oxydation stables, comme par exemple les couples redox Cr^{3+}/Cr^{6+} , Pb^{2+}/Pb^{3+} ou encore Hg^+/Hg^{2+} . Le potentiel

redox peut modifier directement leur degré d'oxydation. Comme le transport des cations à travers des membranes biologiques dépend fortement de leur niveau d'oxydation, la biodisponibilité des métaux est directement influencée par le potentiel redox du milieu (Sposito, 1983). Petrilli et de Flora (1977) ont montré par exemple que le chrome trivalent Cr^{3+} est ni toxique ni mutagène envers *Salmonella typhimurium*, tandis que le chrome hexavalent Cr^{6+} est toxique et mutagène pour cette espèce.

Parallèlement, l'état d'oxydation d'anions présents dans le milieu est susceptible d'être modifié. Ainsi, des conditions réductrices dans un sol peuvent provoquer une conversion du sulfate SO_4^{2-} (oxydation du S : +VI) en sulfure S^{2-} (oxydation du S : -II), qui précipite les métaux lourds sous forme de sulfures métallique tels que ZnS, PbS, HgS, CdS (Babich et Stotzki, 1980).

Le potentiel redox d'un environnement conditionne donc la biodisponibilité des métaux lourds directement et indirectement. Comme les effets du E_h et du pH sont interdépendants, la forme ionique du métal est modifiée conjointement par la disponibilité des électrons et les ions H^+ dans un environnement particulier. Par exemple, le cuivre devient insoluble à tous les E_h si le pH est supérieur à 6, et à un E_h inférieur à +200 mV si le pH est inférieur à 6 (Gadd et Griffiths, 1978).

I.2.3. Influence des anions

Certains anions, tels que S^{2-} , CO_3^{2-} ou PO_4^{3-} forment des composés insolubles avec les métaux lourds, toujours en fonction du pH et du E_h du milieu. Inversement, d'autres anions forment des complexes solubles avec les métaux lourds (Cl^- , NO_3^- , CN^-). La complexation des métaux lourds varie en fonction de la concentration en ligand : par exemple, les complexes MCl^+ , MCl_2 , MCl_3^- et MCl_4^{2-} ($\text{M} = \text{Cd}, \text{Hg}, \text{Pb}, \text{Zn}$) se forment en présence des concentrations croissantes de chlorure, selon la nature du métal et de son affinité pour le ligand (Hahne et Kroontje, 1973).

La nouvelle spéciation du métal (charge négative) modifie sa réactivité chimique. En effet, l'ion métallique libre M^{2+} peut s'adsorber sur les constituants minéraux d'un sol. Mais en présence de chlorure, des complexes d'une charge négative se forment, provoquant une désorption du métal et une augmentation de leur biodisponibilité (Babich et Stotzki, 1977 ; Krenkel, 1974). Le niveau de coordination des complexes métalliques peut affecter la toxicité

pour les microorganismes : certaines bactéries sont plus résistantes aux complexes HgCl_3^- / HgCl_4^{2-} qu'à l'ion libre Hg^{2+} , et inversement, d'autres sont plus sensibles au métal sous forme M^{2+} qu'à ses complexes chloruro et cyanuro (Babich et Stotzki, 1980). Même si les cations métalliques et leurs différents complexes cationiques ou anioniques se fixent sur des sites différents à la surface cellulaire, aucune information précise sur les différents modes inhibiteurs au niveau moléculaire n'est actuellement disponible.

I.2.4. Influence des argiles

Les argiles sont constituées de minerais d'aluminosilicates tels que la kaolinite, l'illite, la montmorillonite, qui sont généralement chargés négativement. Afin de compenser cette charge, des cations peuvent s'adsorber à leur surface. Ils ne constituent pas des composants permanents des argiles, mais sont échangés en permanence avec d'autres cations (Morgan et Stumm, 1991). Les métaux lourds déversés dans l'environnement peuvent également remplacer des cations adsorbés sur les argiles. Ainsi, le métal toxique est immobilisé et donc exclu, au moins temporairement, de la solution du sol et se trouve donc sous forme non disponible (Babich et Stotzki, 1980).

L'adsorption des métaux lourds sur l'argile est influencée par différents facteurs. D'une part, les minerais qui constituent l'argile adsorbent les différents métaux lourds avec des affinités différentes. Ainsi, en présence d'autres cations ayant une meilleure affinité, le métal lourd concerné ne peut pas être adsorbé, mais il reste en solution. Le pH du milieu influence aussi l'adsorption des métaux sur les argiles. En général, l'adsorption augmente de façon proportionnelle, pour des valeurs de pH comprises entre 3 et 7 et décroît à des pH alcalins, pour lesquels les métaux sont précipités.

Un autre facteur qui affecte l'échange des métaux lourds à la surface des argiles est la concentration et le type de ligands présents dans le milieu. Comme déjà mentionné en I.2.3., des anions formant des complexes de charge négative limitent l'adsorption à la surface des argiles. Ce phénomène est dépendant de la stabilité du complexe entre le métal et le ligand : par exemple, Cl^- forme des complexes plus stables que ClO_4^- et inhibe plus fortement l'adsorption des cations métalliques (Farrah et Pickering, 1977 et 1978).

I.2.5. Influence de la matière organique

La matière organique dans les milieux naturels est définie comme une combinaison de (i) biomasse vivante, incluant les animaux, les microorganismes et les racines des plantes, (ii) de la matière biologique morte et en cours de décomposition, (iii) de substances humiques issues de la dégradation de la matière biologique morte. Les substances humiques peuvent être divisées en trois composantes, selon leur solubilité dans l'eau : l'humine (insoluble), les acides humiques (solubles en milieu alcalin) et les acides fulviques (solubles). Les deux derniers composés sont chimiquement réactifs, car ils présentent de nombreux groupements fonctionnels tels que des carboxyle, carbonyle, hydroxyle, amino, imino et sulfhydryle, ainsi que des composés aromatiques (Babich et Stotzki, 1980).

Ces groupements fonctionnels peuvent interagir avec les métaux lourds pour former des complexes ou des chélates qui sont souvent très stables. En présence de groupements sulfhydryles, des liaisons covalentes avec les métaux lourds peuvent même se former. Les métaux chélatés ne sont pas capables de traverser des membranes biologiques. Ainsi, la teneur en matière organique d'un milieu conditionne la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité des métaux lourds (Campbell *et al.*, 2000 ; Welp et Brümmer, 1997). La chélation des métaux lourds par les acides humiques et fulviques augmente avec le pH. En effet, un pH alcalin peut catalyser une déprotonisation des groupements réactifs, ce qui favorise la complexation des cations (Schmitt et Sticher, 1991).

Un facteur non négligeable influençant la biodisponibilité des métaux est la matière organique vivante, et principalement les microorganismes qui possèdent à leur surface des groupements responsables de l'adsorption des métaux. Ce phénomène de biosorption microbienne peut contribuer à l'immobilisation des métaux dans les sédiments (Ramamoorthy *et al.*, 1977) et est actuellement couramment utilisé comme outil de dépollution d'effluents contaminés par des métaux lourds (Lovley et Coates, 1997).

I.3. La résistance des microorganismes aux métaux lourds

L'origine de la Vie s'est probablement développée autour de sources hydrothermales océaniques, fortement chargées en métaux lourds comme Zn, Cu, Hg ou Pb (Rasmussen, 2000). Ainsi, le défi principal des premières cellules consistait à maintenir une concentration intracellulaire appropriée en éléments traces essentiels et à exclure en même temps des

métaux toxiques. Ce défi environnemental ancien était probablement un moteur qui a permis l'évolution des mécanismes d'homéostasie et de détoxification des métaux lourds (Gatti *et al.*, 2000). Ainsi, les microorganismes ont développé des systèmes de résistance pour faire face aux stress générés par les métaux toxiques. Ces systèmes, qui sont basés sur des gènes chromosomiques, plasmidiques ou encore sur des transposons, confèrent des résistances à la quasi-totalité des éléments du tableau périodique (Silver et Misra, 1988 ; Silver 1998).

Chez les microorganismes, les principaux mécanismes de détoxification des métaux concernent :

a) L'exclusion du métal toxique par une barrière de perméabilité :

Il s'agit de systèmes non spécifiques qui empêchent l'entrée du métal dans la cellule : (i) soit par altération de systèmes de transport membranaires ; (ii) soit par fixation du métal à la surface cellulaire par des composants de la membrane externe, de la paroi ou d'exopolysaccharides (Bruins *et al.*, 2000).

b) La séquestration intracellulaire ou extracellulaire par des composantes cellulaires qui lient des métaux :

L'accumulation intracellulaire s'effectue notamment dans le cytoplasme par des métallothionéines. Il s'agit de petites protéines riches en cystéines qui fixent des métaux lourds au niveau des groupements sulfhydryles. Ainsi, elles piègent les métaux à l'intérieur de la cellule et les rendent inoffensifs (Silver et Phung, 1996). Notons que les métallothionéines sont présentes chez la plupart des eucaryotes (animaux, végétaux, mycètes, levures), mais qu'elles n'ont pu être mises en évidence que chez un nombre très restreint de bactéries, notamment les cyanobactéries *Synechococcus* et *Synechocystis* (Turner et Robinson, 1995).

A l'extérieur d'un microorganisme, les métaux peuvent également être immobilisés par complexation ou précipitation. Des sous-produits du métabolisme microbien tels que le H₂S produit par les bactéries sulfato-réductrices, ou encore le phosphate produit par *Citrobacter* entraînent la précipitation des métaux (Bruins *et al.*, 2000). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'excrétion de glutathion fixe des métaux par complexation (Murata *et al.*, 1985), et chez *Alcaligenes eutrophus*, la précipitation des métaux est liée à une augmentation du pH à l'extérieur de la cellule (Collard *et al.*, 1994).

c) La transformation enzymatique d'un métal :

La résistance au mercure conférée par l'opéron *mer* est l'exemple le mieux connu. Cet opéron, présent sur des transposons ou des plasmides, existe chez plusieurs espèces bactériennes, dont *E. coli*. Les gènes *mer* codent pour des enzymes qui transportent le mercure vers l'intérieur de la cellule, où le composé est détoxiqué par réduction en mercure élémentaire (Hg^0) qui diffuse à travers la membrane cellulaire (Misra, 1992). L'expression de l'opéron *mer* est régulée par MerR, une protéine qui se fixe sur l'opérateur/promoteur de l'opéron et empêche ainsi sa transcription. En présence de mercure, MerR active l'expression du système de détoxification (Summers, 1992).

Parmi les autres systèmes de détoxification identifiés, citons l'opéron *ars* qui permet la réduction de l'arsénate en arsénite qui est ensuite expulsé hors de la cellule (Silver, 1996a) et un système de réduction du Cr(VI) vers le Cr(III) qui est moins toxique (Silver, 1992).

d) Le transport actif par des systèmes d'expulsion :

C'est le système majoritaire impliqué dans la résistance des microorganismes envers les métaux lourds. Il implique des protéines membranaires très spécifiques qui exportent les métaux toxiques du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Chez les bactéries, deux principaux systèmes de transport actif peuvent être distingués selon la source d'énergie : les transporteurs chimiosmotiques et les ATPases de type P.

Les transporteurs chimiosmotiques utilisent un potentiel membranaire comme source d'énergie pour actionner l'expulsion des métaux toxiques. Les exemples les mieux étudiés de cette forme de transporteurs sont ArsB, codé par l'opéron de résistance à l'arsenic, et les transporteurs codés par les opérons *cnr* et *czc* chez *Alcaligenes eutrophus*. ArsB existe chez plusieurs bactéries gram négatives et gram positives. Il exporte spécifiquement l'arsénite et l'antimoine (Silver, 1996b). Les gènes *czc* (pour résistance à Cd^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+}) et *cnr* (pour résistance à Co^{2+} et Ni^{2+}) ont été découverts sur des grands plasmides. Ces opérons codent des protéines membranaires qui agissent comme antiporteur proton/cation, c'est-à-dire que pour chaque cation bivalent exporté, deux protons sont importés (Nies, 1992).

Les ATPases de type P représentent une classe importante de protéines membranaires qui servent à maintenir des conditions ioniques convenables par une translocation active de cations à travers les membranes biologiques. Cette translocation est possible même contre un gradient électrochimique, grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP (Lutsenko et Kaplan, 1995). Plus de 100 membres de cette famille de transporteurs ont été identifiés ; ils jouent des rôles clés dans l'homéostasie des métaux chez diverses espèces, de la bactérie à

l'homme, et transportent un grand nombre d'ions différents. Chez les procaryotes, c'est notamment les ATPases de type P qui confèrent la résistance aux métaux lourds ; ils forment ainsi une sous-classe d'ATPases, appelé les ATPases de type CPx car ils portent un motif conservé CPx dans la séquence des acides aminés d'un segment transmembranaire (Solioz et Vulpe, 1996).

ATPase de type P	Métaux transportés	Organisme	Régulateur	Famille de régulateurs	Référence
<i>cadA</i>	Cd, Pb, Bi	<i>Staphylococcus aureus</i>	CadC	ArsR	Endo et Silver, 1995
<i>coaT</i>	Co	<i>Synechocystis PCC 6803</i>	CoaR	MerR	Rutherford <i>et al.</i> , 1999
<i>copA</i>	Cu	<i>Escherichia coli</i>	CopR	MerR	Petersen et Moller, 2000
<i>zntA</i>	Cd, Pb, Zn	<i>Escherichia coli</i>	ZntR	MerR	Beard <i>et al.</i> , 1997

Tableau 5 : Exemples de ATPases de type P procaryotes et leurs régulateurs transcriptionnels correspondants.

La particularité des mécanismes de détoxification enzymatique (c) et des transporteurs de cations métalliques (d) est leur spécificité pour les ions métalliques qu'ils détoxiquent. En effet, ces protéines présentent des sites de reconnaissance ayant une grande affinité envers le métal transporté. Ainsi, l'organisme peut faire la distinction entre les métaux toxiques à éliminer et les éléments traces essentiels dont la concentration intracellulaire doit être régulée (Gadd, 1992).

De plus, la régulation de l'expression des gènes codant pour des systèmes de résistance est généralement inductible par le métal à détoxiquer. Ainsi, quand un organisme est exposé à des concentrations en métaux trop élevées, la synthèse de ses systèmes de détoxification est initiée. Cette réponse génétiquement programmée nécessite un capteur moléculaire spécifique permettant de détecter les métaux lourds présents dans la cellule. Cette tâche est accomplie par des protéines qui régulent la transcription des gènes de résistance (Silver et Walderhaug, 1992). Ce mécanisme de régulation sera décrit en détail dans le paragraphe I.3.1.2.

Les deux régulateurs transcriptionnels les mieux étudiés sont ArsR de l'opéron *ars* et MerR de l'opéron *mer*. ArsR est un régulateur négatif. En absence d'arsenic, il se fixe sur l'opérateur de l'opéron *ars* et réprime son expression. En présence d'arsénite ou d'arsénate, le complexe ArsR-As se décroche de l'opérateur et l'expression de l'opéron peut alors être

initiée (Wu et Rosen, 1991). En revanche, MerR régule la transcription des gènes *mer* de façon positive, selon un mécanisme de torsion de l'ADN, et ce en réponse spécifiquement à la présence de mercure (Ansari *et al.*, 1995 ; Summers, 1992).

Des protéines régulatrices nouvellement identifiées chez différentes espèces bactériennes et impliquées dans la détoxification des métaux présentent souvent des identités de séquence avec MerR ou ArsR. Selon leur mode de fonctionnement, elles sont classées dans l'un ou l'autre de ces types de régulateurs. Ainsi, CadC, le régulateur du gène codant le transporteur de cadmium *cadA* chez *Staphylococcus aureus*, et SmtB, le répresseur du gène *smtA* codant la métallothionéine des cyanobactéries, font partie de la famille des régulateurs de type ArsR (Silver et Phung, 1996). ZntR, CoaR et CopR (également nommé CueR ; Outten *et al.*, 2000 ; Petersen et Moller, 2000) sont des régulateurs activés respectivement par le zinc, le cobalt et le cuivre et leur mode de régulation semble similaire à celui de MerR (Outten *et al.*, 1999 ; Rutherford *et al.*, 1999) (tableau 5). Même si ces différentes protéines régulatrices ont des motifs structuraux en commun, ils ont la capacité de distinguer différents métaux lourds et fixent avec une grande spécificité le ou les ion(s) concerné(s).

I.3.1. Fonctionnement des ATPases de type CPx

I.3.1.1. Caractéristiques structurales

La famille des ATPases de type CPx, représentée par la protéine CadA isolée de *Staphylococcus aureus*, présente des caractéristiques structurales qui sont résumées dans la figure 1.

Dans la partie N-terminale de l'enzyme se trouve le site de liaison aux métaux, caractérisé par la présence d'un ou plusieurs motifs CxxC. Ce motif existe également chez d'autres protéines qui interagissent avec une variété de métaux. Cependant, même si le motif CxxC est responsable de la fixation du métal, les résidus impliqués dans la spécificité de reconnaissance du métal ne sont pas clairement identifiés (Silver *et al.*, 1993 ; Solioz et Vulpe, 1996).

La partie catalytique est composée d'un domaine phosphatase et d'un domaine aspartyl kinase, contenant respectivement les motifs conservés TGES et DKTGT. Dans le cycle réactionnel de l'ATPase, un résidu aspartate (D415) est phosphorylé par l'ATP (Pedersen et Carafoli, 1987). Ensuite, une déphosphorylation de l'acylphosphate par le domaine de la

phosphatase entraîne un changement conformationnel de la protéine et de façon concomitante, le transport des ions à travers la membrane.

Enfin, un motif CPH, CPS ou CPC est présent dans une région transmembranaire qui forme le canal de transport des cations. Ce motif CPx est caractéristique de ce type de transporteurs, et il semble jouer un rôle primordial dans la translocation des métaux lourds (Solioz et Vulpe, 1996).

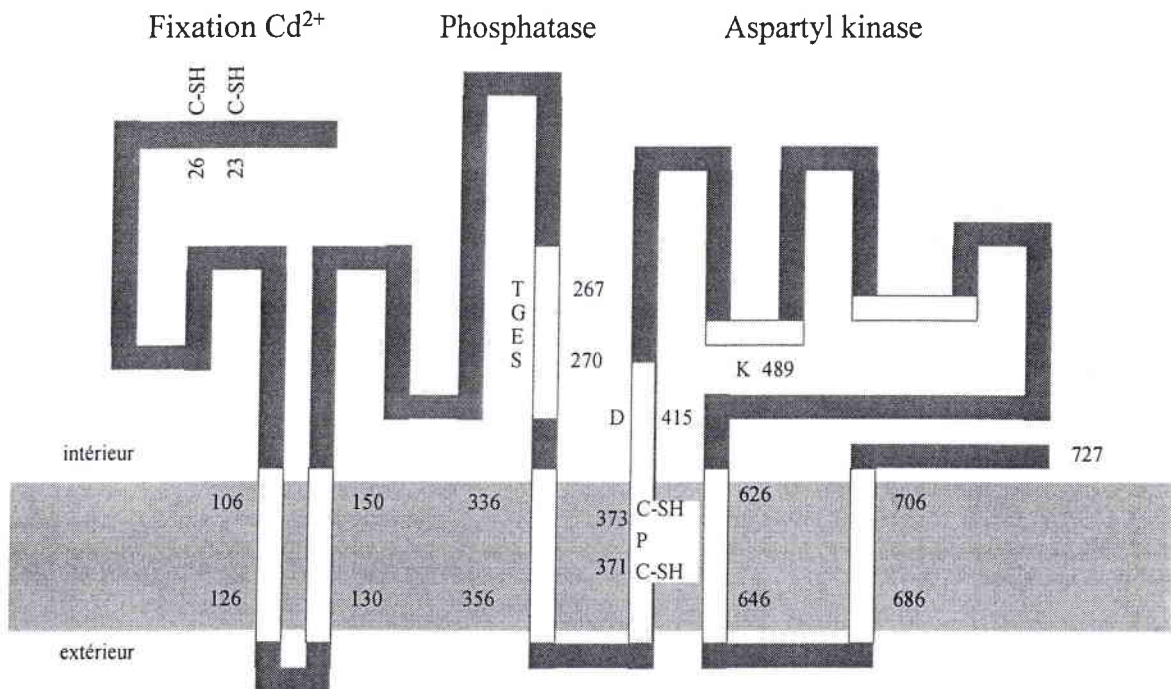


Figure 1 : Structure schématique de CadA de *S. aureus* (d'après Silver, 1996b).

1.3.1.2. Régulation de l'expression : cas du gène *zntA*

Rensing *et al.* (1997) ont montré que ZntA est un homologue de CadA avec une identité de 35% des résidus. Ainsi, la protéine ZntA d'*Escherichia coli* fait partie de la famille des ATPases de type CPx. Elle contribue à la tolérance de la bactérie au cadmium et au plomb, ainsi qu'au maintien de concentrations intracellulaires de zinc à un niveau non toxique. En effet, il a été démontré par l'utilisation des vésicules membranaires inversées que ZntA exporte des cations de Zn(II), de Cd(II) et de Pb(II) (Rensing *et al.*, 1997 et 1998). En revanche, aucune activité de translocation n'a pu être mise en évidence pour d'autres métaux.

L'expression de *zntA* est régulée par ZntR, une protéine qui fait partie de la famille des activateurs transcriptionnels procaryotes de type MerR (Brocklehurst *et al.*, 1999). Plusieurs membres de cette famille de régulateurs ont été identifiés récemment chez différentes

espèces. En effet, leur fonction consiste en la régulation de l'expression génétique de systèmes de résistance ou d'homéostasie en métaux (Fuentes et Amabile-Cuevas, 1997 ; Noll *et al.*, 1998 ; Outten *et al.*, 2000 ; Petersen et Moller, 2000 ; Rutherford *et al.*, 1999). Ces protéines présentent de fortes identités de séquence et des similarités dans leur mode de fonctionnement. Ainsi, la région N-terminale comporte un motif hélice-tour-hélice de fixation à l'ADN (Ansari *et al.*, 1995) et le domaine C-terminal comporte plusieurs résidus cystéines impliqués dans la fixation des ions métalliques inducteurs (Zeng *et al.*, 1998).

L'homologue le plus proche de ZntR est MerR. En effet, MerR et ZntR présentent une identité de 34%, et leur mode de fonctionnement est également comparable : ZntR forme un complexe avec une séquence palindromique de 20 pb du promoteur de *zntA* (P_{zntA}), qui est situé entre les sites -10 et -35. Ce complexe, ZntR- P_{zntA} , empêche la fixation correcte de l'ARN polymérase et, par conséquent, l'initiation de la transcription. Lorsqu'un activateur tel que Zn(II) est présent, un changement allostérique de ZntR se produit, ce qui entraîne la formation d'un complexe avec la RNA polymérase (Zn-ZntR/ P_{zntA} /RNAPol) et une courbure de la région promotrice provoquant une extension du promoteur : la transcription est ainsi initiée (Figure 2 ; Outten *et al.*, 1999).

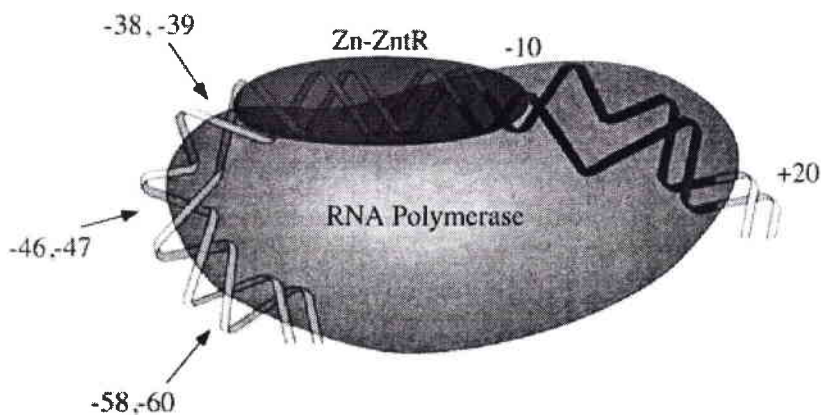


Figure 2 : Modèle du complexe Zn-ZntR/ P_{zntA} /RNAPol qui montre la structure du promoteur étendue (d'après Outten *et al.*, 1999).

Ce mécanisme a été confirmé pour la présence de Zn(II), mais on suppose que Cd(II) ou Pb(II) induisent la transcription de *zntA* selon un mécanisme similaire (Outten *et al.*, 1999). Le mercure a également été identifié comme inducteur transcriptionnel de *zntA* (Babai et Ron, 1998 ; Binet et Poole, 2000), mais cet élément ne fait pas partie des substrats de ZntA. Ainsi, le mercure est considéré comme un inducteur gratuit. Brocklehurst *et al.* (1999) ont émis l'hypothèse qu'il s'agit d'une réactivité croisée entre le régulateur ZntR avec le mercure.

II. Les biocapteurs

Traditionnellement, l'analyse environnementale des métaux lourds se fait grâce à des méthodes physico-chimiques (AAS, MS, HPLC, GC). Si celles-ci sont très fiables, elles sont aussi coûteuses et ne permettent pas de distinguer la fraction biodisponible des métaux dans l'échantillon analysé. Ainsi, depuis une dizaine d'années, des recherches sont menées pour exploiter la capacité de certains organismes à détecter les métaux biodisponibles. Ces "biocapteurs" seront définis dans une première partie. Puis, nous détaillerons le cas particulier des biocapteurs bactériens. Ensuite, nous exposerons les méthodologies ainsi que leur principe utilisées pour construire ce type de biocapteurs. Enfin, nous terminerons par les applications concrètes de tels outils.

II.1 Le principe du biocapteur

Un biocapteur (aussi appelé biodétecteur ou biosenseur) peut se définir comme appareil analytique comprenant une composante biologique qui est couplée avec un appareil de mesure physico-chimique nommé transducteur (Figure 3). En effet, la composante biologique réagit avec l'échantillon à analyser. Elle capte donc l'analyte, pour traduire cette réaction en un signal qui est quantifiable par le système transducteur-processeur (Simpson *et al.*, 1998). Le processeur sert à modéliser les données afin de les visualiser de façon appropriée. En général, les biocapteurs sont construits de manière à ce que le signal produit soit proportionnel à la concentration de l'analyte (van der Lelie *et al.*, 1994).

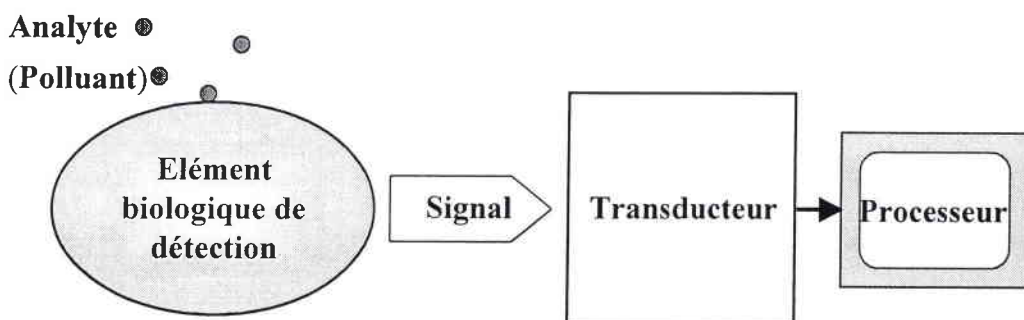


Figure 3 : Représentation schématique d'un biocapteur.

La composante biologique du biocapteur peut être divisée en trois groupes, les comportementales, les catalytiques et les non-catalytiques. Le groupe des comportementales comprend les organismes plus évolués (daphnies, moules, poissons), le groupe catalytique inclut des enzymes, des microorganismes et tissus, tandis que le groupe des non-catalytiques ou d'affinité comprend des anticorps, des récepteurs et des acides nucléiques (Van der Lelie *et al.*, 1994).

La technologie des transducteurs inclut des éléments électrochimiques (ampérométrie, potentiométrie, et conductimétrie) et optiques, qui mesure des changements comme l'absorption, la fluorescence, et l'émission de lumière. Des dispositifs existent aussi pour mesurer des changements calorimétriques et acoustiques (Sethi, 1994).

Dans le but de développer un dispositif de "monitoring environnemental", l'utilisation des microorganismes vivants portant des propriétés intéressantes, sera exploité. La combinaison entre une bactérie, qui joue le rôle d'élément biologique, et un transducteur approprié forme un biocapteur bactérien.

II.2 Les biocapteurs bactériens

Les bactéries constituent un matériel biologique intéressant pour la conception d'un biocapteur. En effet, elles vivent dans quasiment tous les environnements naturels, sont faciles à manipuler et constituent un réservoir d'enzymes en grande partie inexploré. Un grand avantage de l'utilisation des bactéries est qu'elles peuvent rapidement être produites en grande quantité et à moindre coût. Leur réponse à tout changement du milieu est rapide, ce qui en fait de bons indicateurs de perturbation de leur environnement (Briscoe *et al.*, 1996).

La sensibilité des microorganismes vis-à-vis de polluants divers a mené au développement d'un certain nombre de tests microbiens non-spécifiques au polluant particulier. L'exemple le mieux connu est le test Microtox qui est basé sur une bactérie naturellement luminescente (*Photobacterium phosphoreum*) dont la luminescence est altérée en présence de substances toxiques (Blaise *et al.*, 1994), ou le système SOS Chromotest, basé sur la mesure de l'expression d'un gène de la réponse SOS chez *E. coli* permettant l'évaluation de la génotoxicité de substances chimiques (Quillardet *et al.*, 1982).

Ces tests sont, grâce à leur rapidité et leur réponse significative sur la biodisponibilité, commercialisés et largement utilisés dans l'analyse environnementale pour évaluer la (géo-) toxicité d'un échantillon. Afin d'analyser spécifiquement la présence d'une substance, d'autres types de biocapteurs utilisant des bactéries recombinées ont été développés.

Cette approche est fondée sur le principe que tous les organismes ont développé la capacité de percevoir des changements spécifiques de leur environnement, ainsi que des stratégies pour faire face à ces changements. Ces stratégies impliquent souvent l'induction (ou la répression) de certains gènes pour réorienter la physiologie cellulaire afin de s'adapter aux modifications du milieu (DuBow, 1997). Cette réponse génétique peut être déclenchée, par exemple, pour métaboliser une substance particulière, comme c'est le cas de l'opéron *lac* d'*E. coli* (Jacob *et al.*, 1965), ou bien pour restaurer l'altération enzymatique après un choc thermique (Heat-Shock Response ; Hemmingsen *et al.*, 1988), ou encore pour détoxifier des composés toxiques. En effet, les bactéries ont développé des réponses génétiquement programmées à une grande variété de molécules nocives dans leur environnement. Le rôle des protéines codées par les gènes correspondants consiste à éliminer la substance soit par voie métabolique (biodégradation), comme c'est le cas pour la plupart des composés organiques, soit par extrusion, généralement utilisée pour des polluants inorganiques.

Dans ce contexte, on peut citer les gènes impliqués dans la biodégradation du biphenyle et des PCB, organisés dans l'opéron *bph* chez *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Furukawa et Miyazaki, 1986). Les gènes de l'opéron *bph* codent pour des enzymes qui dégradent entièrement plusieurs composés aromatiques, à priori nocifs pour les organismes vivants, en produits inoffensifs. De plus, comme décrit dans la partie I de ce chapitre, il existe des gènes codant pour de nombreuses protéines qui servent de pompes d'efflux spécifiques des ions métalliques particuliers, et qui augmentent ainsi la résistance des microorganismes envers ces substances (Silver et Phung, 1996).

Ces gènes ont en commun que leur expression est régulée par la présence du polluant même. Inversement, un changement de l'expression de ces gènes indique sa présence. Ainsi, le principe de fonctionnement du biocapteur est basé sur la mesure de l'expression génétique, à l'aide de la technique de fusion génétique décrite ci-dessous.

II.3. Construction de biocapteurs bactériens

II.3.1. La fusion transcriptionnelle

Comme le montre la figure 4, la fusion transcriptionnelle consiste à placer un gène rapporteur dépourvu de son propre promoteur en aval des signaux de transcriptions d'un gène cible (gène X), dont la transcription est induite par une substance particulière. Le gène rapporteur est ainsi soumis à la régulation transcriptionnelle du gène X et, par conséquent, est exprimé en présence de la substance inductrice. Comme le produit du gène rapporteur est détectable, on peut mesurer l'expression du gène X. Ainsi, la réponse génétiquement programmée de l'organisme se traduit en un signal détectable lorsqu'elle est fusionnée au gène rapporteur, et à l'aide de cet organisme rapporteur, on peut détecter la substance inductrice à laquelle il est exposé.

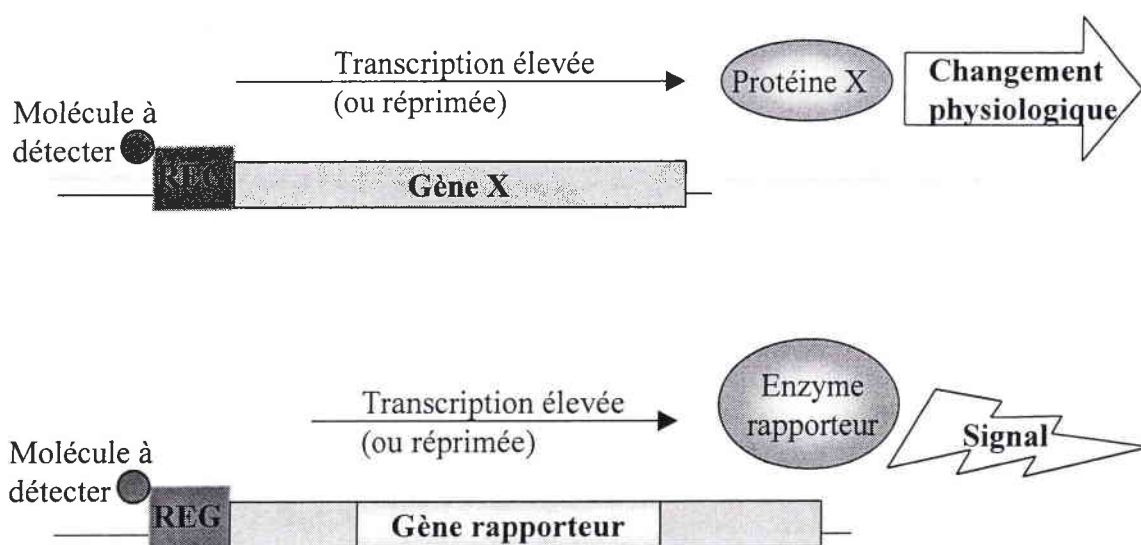


Figure 4 : Principe de la fusion transcriptionnelle dans un biocapteur à gènes rapporteurs.

REG symbolise le régulateur du gène X qui reconnaît spécifiquement l'analyte.

II.3.2. Les gènes rapporteurs

Un système de gène rapporteur est composé d'un gène particulier, dépourvu de ses propres séquences régulatrices, qui est placé en aval d'un promoteur exogène. Ainsi, le produit

du gène, rapporte l'activité transcriptionnelle du promoteur auquel il est fusionné. Afin d'être utile comme rapporteur, le produit du gène doit répondre à certains critères :

(i) Le produit du gène rapporteur doit être facilement détectable et quantifiable avec une grande sensibilité.

(ii) Pour des applications environnementales, le produit du gène rapporteur doit être absent de l'échantillon à évaluer et dans l'organisme qui sert de biocapteur. Cela provoquerait des interférences résultant en une baisse de la sensibilité de l'essai.

(iii) L'organisme qui porte le gène rapporteur est exposé à des conditions environnementales variables. Ainsi, un système de rapporteur optimal ne devrait pas être affecté par les influences extérieures. Ceci concerne notamment l'enzyme et ses cofacteurs : en effet, les produits génétiques peuvent être affectés par des facteurs environnementales ou physiologiques, ce qui nécessite une définition des facteurs qui influent le test et une standardisation du protocole.

(iv) Le produit d'un gène rapporteur permet une estimation en temps réel du niveau de transcription du gène auquel il est fusionné. Un produit qui est stable dans la cellule peut s'accumuler et ainsi conduire à une surestimation du niveau d'expression. Si le produit est peu stable, il n'y a pas d'accumulation du produit et la cinétique de la transcription peut être mesurée. Il s'agit donc de sélectionner le gène rapporteur selon l'utilisation entre la sensibilité et l'intensité du test (Loper et Lindow, 1997).

Les gènes rapporteurs les plus fréquemment utilisés pour mesurer l'expression génétique dans des bactéries comme *Escherichia coli* sont décrits ci-dessous.

lacZ

Le gène *lacZ* code pour la β -galactosidase, un enzyme qui catalyse l'hydrolyse de lactose en glucose et galactose. Cet enzyme est quantifiable par un essai colorimétrique. On dispose de substrats chromogènes, le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et ONPG (o-nitrophényle- β -D-galactoside) qui génèrent respectivement des colorations bleues et jaunes lorsqu'ils sont hydrolysés par la β -galactosidase. Ainsi, une quantification de la β -galactosidase produite est possible soit visuellement *in vivo*, soit par spectrophotométrie *in vitro*. Ce dosage quantitatif exige une extraction de l'enzyme par lyse des bactéries et un apport de substrat (Silhavy et Beckwith, 1985), ce qui exclut la détection en ligne et en temps

réel. Il existe pourtant des substrats de la β -galactosidase qui génèrent des produits fluorescents et qui permettent donc une mesure en ligne (Zhang *et al.*, 1991). Mais ces substrats sont malheureusement très coûteux.

Le gène rapporteur *lacZ* est très couramment utilisé pour étudier la régulation génétique des bactéries ainsi que des organismes eucaryotes. D'une part, parce que sa détection est facile, et d'autre part, parce qu'on dispose d'un grand nombre de vecteurs plasmidiques et de transposons pour créer des fusions transcriptionnelles dans des souches mutées au niveau du gène *lacZ* (Casadaban et Cohen, 1979 ; Slauch et Silhavy, 1991).

xylE

Isolé du plasmide TOL de *Pseudomonas putida*, *xylE* code pour la catéchol-2,3-oxygenase, qui catalyse la conversion de catéchol en semialdéhyde 2-hydroxymuconique, un pigment de couleur jaune qui peut être visualisé ou mesuré par spectrophotométrie (Schweizer, 1993). Comme pour *lacZ*, le produit du gène *xylE* est dosé après lyse cellulaire. L'avantage de ce gène rapporteur est que *xylE* n'est pas commun dans des microorganismes autres que *Pseudomonas*. Mais la stabilité de la catéchol-2,3-oxygenase varie fortement avec la disponibilité en oxygène et l'état physiologique de la cellule. Ces facteurs doivent donc être pris en compte pour la quantification de cette activité enzymatique (Loper et Lindow, 1997).

GFP

La GFP (green fluorescent protein) est une protéine fluorescente de la méduse *Aequorea victoria* qui absorbe la lumière bleue à 395 nm et émet une lumière verte à 509 nm (Chalfie *et al.*, 1994). La quantification de la GFP se fait par spectroscopie de fluorescence. Cette technique est donc non-destructive, permettant ainsi la mesure sur des organismes vivants et en temps réel.

L'avantage de la GFP est qu'elle fluoresce de manière intrinsèque après excitation et ne nécessite pas l'ajout de substrat ou de cofacteur. La formation du chromophore responsable de la fluorescence est une réaction autocatalytique qui a lieu en présence d'oxygène. Cependant, l'émission de la fluorescence elle-même ne requiert pas d'oxygène (Cody *et al.*, 1993). Ainsi, les influences de la physiologie cellulaire ou du milieu sur l'activité sont négligeables, ce qui permet la visualisation de la transcription des gènes à priori sous des conditions variables.

La GFP est une protéine très stable et peut donc s'accumuler dans la cellule, ce qui s'avère gênant lorsqu'il s'agit de suivre les variations de l'expression du gène auquel elle est fusionnée (Errampali *et al.*, 1999). En effet, une fois la GFP produite dans des bactéries, le

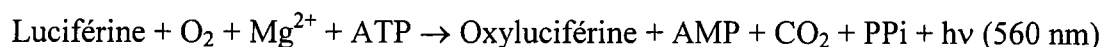
signal de fluorescence associé persiste pendant des heures et s'accumule, ce qui ne permet pas l'utilisation de ce type de gène rapporteur pour rendre compte de variations rapides de concentrations en molécules à doser. Cependant, des formes mutantes de GFP beaucoup moins stables que la protéine naturelle ont récemment été obtenues, permettant de donner un signal de fluorescence transitoire (Anderson *et al.*, 1998).

luxAB, luc

Il s'agit de gènes qui confèrent la bioluminescence. Le gène *luc* code pour la luciférase eucaryote, qui est responsable par exemple de la luminescence de la luciole *Photinus pyralis* (Palomares *et al.*, 1989). La réaction catalysée par la luciférase eucaryote nécessite le substrat luciférine, un acide carboxylique hétérocyclique qui est oxydé en présence d'ATP et d'oxygène (figure 5). Cette conversion résulte en une émission de lumière à 560 nm (Cebolla *et al.*, 1995). Dans le cas du gène *luc*, la réaction de la luminescence est dépendante de l'apport en ATP et donc de la physiologie cellulaire.

La luciférase bactérienne, codée par les gènes *luxAB*, est notamment originaire des bactéries marines telles que *Vibrio harveyi* et *fischeri* (Meighen, 1991). En présence d'oxygène et de la forme réduite de flavine mononucléotide (FMNH₂), la luciférase bactérienne oxyde un aldéhyde aliphatique en acide organique avec une émission concomitante de lumière à 490 nm (figure 5). L'oxygène et FMNH₂ sont disponibles dans la plupart des cellules bactériennes aérobies, tandis que l'aldéhyde est synthétisé dans les bactéries naturellement luminescentes par les produits des gènes *luxCDE*, codant pour le complexe de l'acide gras reductase (Wall *et al.*, 1986). Ainsi, lors de l'utilisation de la totalité de l'opéron *lux* (*luxCDABE*) comme rapporteur, aucun apport de substrat externes n'est nécessaire (Meighen, 1994 ; Stewart et Williams, 1992).

Eucaryote (*luc*) :



Procaryote (*luxAB*) :

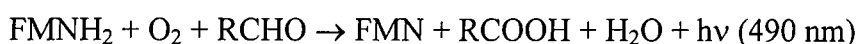


Figure 5 : Réactions catalysées par les luciférases eucaryotes et procaryotes.

La détection qualitative de la lumière émise par les organismes bioluminescents peut se faire soit par autoradiographie, soit visuellement dans des conditions de forte activité. Une méthode plus sophistiquée est la microscopie CCD (Charge Coupled Device) qui permet la détection de la lumière à l'échelle d'une cellule isolée (Silcock *et al.*, 1992). Pour la quantification de la lumière, on dispose de luminomètres ou de compteurs de scintillation, qui sont des instruments de grande sensibilité permettant une mesure facile de faibles variations de luminescence. Il en existe également des modèles réduits et portables, et donc applicables pour des mesures sur le terrain.

Comme la GFP, la mesure de la luminescence est réalisable de façon non-destructive et en temps réel, sans ajout de substrats supplémentaires. Mais cette réaction nécessite une activité métabolique bactérienne élevée, ainsi que de l'abondance en oxygène et en FMNH₂. Un essai de bioluminescence ne peut donc pas être effectué en milieu anaérobie ou dans des conditions métaboliques particulières limitant la production de FMNH₂. De plus, l'aldéhyde, qui est nécessaire à la réaction de la bioluminescence, est synthétisé à partir des substances qui servent à la production des lipides dans la cellule (Heitzer *et al.*, 1998). Le transfert de ces substances vers le complexe de l'acide gras réductase est donc limité selon la disponibilité des lipides. La complexité de la réaction de bioluminescence est résumée en figure 6.

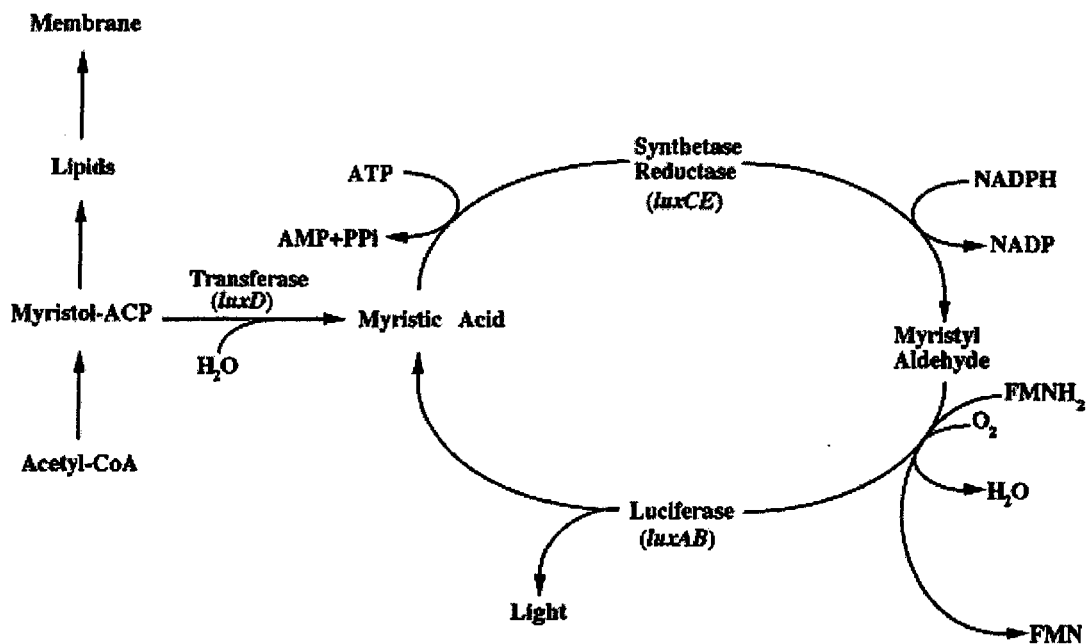


Figure 6 : Diagramme des réactions biochimiques comprises dans la réponse de bioluminescence (d'après Heitzer *et al.*, 1998).

La luciférase bactérienne est un enzyme stable, la mesure de changements rapides de l'activité transcriptionnelle est difficilement possible en raison d'une probable accumulation de l'enzyme dans le cytosol. Seul la luciférase de *Vibrio fischeri* montre une thermolabilité au dessus de 30°C (Stewart et Williams, 1992). Ainsi, en utilisant cette luciférase, la réponse génétique courante peut être mesurée après un traitement de choc thermique léger à 37°C, ce qui dénature l'enzyme.

II.3.3. Les constructions avec vecteurs de clonage et transposons

Les techniques de fusion de gènes ont révolutionné la génétique bactérienne, car elle permettent d'affecter à un gène un phénotype facile à étudier. Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, quantités de méthodes ont été développées pour construire des fusions génétiques (Slauch et Silhavy, 1991). Elles sont généralement basées sur l'utilisation d'éléments transposables ou de vecteurs plasmidiques portant le gène rapporteur d'intérêt.

Transposons

L'intégration d'un gène rapporteur dans le chromosome bactérien peut s'effectuer à l'aide d'éléments transposables tels que ceux dérivés du phage Mu (Groisman, 1991 ; Alexander et DuBow, 1998) ou de transposons de type Tn (Kleckner *et al.*, 1991). De nombreuses constructions dérivées de ces transposons et contenant différents gènes rapporteurs tels que *lacZ* ou *luxAB* sont disponibles (Casadaban et Cohen, 1979 ; Kroos et Kaiser, 1984 ; Engebrecht *et al.*, 1985 ; Guzzo et DuBow, 1991).

Ces transposons sont capables de s'intégrer dans le chromosome de la bactérie hôte de façon aléatoire. Si la transposition se fait dans une séquence codante du génome, la fonction du gène peut être altérée, créant ainsi un mutant. Parallèlement, si le transposon portant un gène rapporteur, dépourvu de ses séquences régulatrices, fusionne avec la région codante d'un gène, l'intégration permet de placer la transcription du gène rapporteur sous contrôle du régulateur du gène fusionné (Berg et Berg, 1996).

En infectant une souche bactérienne avec un tel transposon, on peut créer une banque de fusions transcriptionnelles, dans laquelle chaque clone porte une copie du gène rapporteur fusionné aléatoirement avec un gène particulier du chromosome bactérien. En utilisant une telle banque, il est possible de mesurer l'expression des gènes non-essentiels lors d'un

changement environnemental et de détecter ainsi des réponses génétiquement programmées à un stress particulier (Guzzo et DuBow, 1991 et 1994a).

Par cette approche, plusieurs nouveaux gènes ou des nouvelles fonctions de gènes déjà connus ont pu être identifiés (Slauch et Silhavy, 1991). C'est notamment le cas pour des gènes inductibles par un stress chimique. Ainsi, chez *E. coli*, des gènes inductibles par l'aluminium (Guzzo *et al.*, 1992), le nickel (Guzzo et DuBow, 1994b), l'arsenic (Diorio *et al.*, 1995), le sélénium (Guzzo et DuBow, 2000) et le mercure (Riether *et al.*, 2000) ont été identifiés.

Le premier transposon modifié par insertion du gène rapporteur *lacZ* est le phage Mud1*lac*. Ce bactériophage défectif s'insère au hasard dans l'ADN chromosomique ou plasmidique d'*E. coli* (Casadaban et Cohen, 1979). Le gène rapporteur *lacZ* est situé à proximité de la terminaison droite du phage (MuR), de sorte qu'une insertion de Mud1*lac* dans un gène particulier place le gène *lacZ* sous contrôle de régulation du gène interrompu (Metcalf *et al.*, 1990). A l'aide de ce phage, de nombreuses études de l'expression génétique ont été effectuées.

Vecteurs

Des vecteurs de clonage portant des gènes rapporteurs ont été développés pour différentes espèces bactériennes et il est difficile d'en établir une liste exhaustive. De façon générale, ces plasmides portent des sites de clonage multiple, qui sont situés en amont du gène rapporteur afin de soumettre l'expression de ces gènes sous contrôle du promoteur inséré. Ces vecteurs de clonage servent à étudier la régulation d'un gène particulier, car on peut mesurer l'augmentation ou la répression de l'expression génétique directement par la quantification du gène rapporteur.

Certains exemples de construction utilisant les gènes *luxAB* de *Vibrio harveyi* ont été faites par Farinha et Kropinski (1990) dans le plasmide pQF70, qui est convenable pour analyser des promoteurs dans une large gamme de bactéries gram négatives. Ce vecteur a besoin d'ajout d'un aldéhyde aliphatique à chaîne longue comme substrat de la luciférase. Une construction avec l'entière cassette des gènes *luxCDABE* de *Vibrio fischeri* a été réalisée dans le plasmide pUCD615 (Rogowsky *et al.*, 1987). Dans ce vecteur, les gènes qui codent la production et le recyclage du substrat (*luxCDE*) sont déjà présents, et le suivi de l'expression génétique dans la cellule est donc possible sans ajout de substrat. Par ailleurs, ce vecteur fait partie du groupe de plasmides IncW, ce qui permet son maintien dans de nombreuses bactéries gram-négatives (Valentine et Kado, 1989).

II.4. Applications environnementales des biocapteurs bactériens

En parallèle des analyses environnementales classiques, le développement des biocapteurs bactériens permet la détection de quantités biodisponibles de certaines (classes de) substances polluantes dans des échantillons naturels.

Pour une évaluation des risques provenant d'un site pollué, par exemple, il est indispensable de connaître cette donnée de la biodisponibilité d'un polluant. Cette évaluation est à la base d'une décision sur l'utilisation future du site et les possibilités de la remédiation. Notamment pour la bioremédiation, il est important de savoir si les polluants sont disponibles aux organismes utilisés pour la biodégradation (Corbisier, 1997).

Par l'approche du biocapteur bactérien à gènes rapporteurs, seule la fraction disponible à la bactérie est détectée, car un tel biorapporteur ne peut répondre à la présence d'un composé que lorsqu'il l'a adsorbé, et que la réponse génétique a été déclenchée. Dans ce cas, la bactérie sert de modèle pour le suivi de la présence d'un produit particulier aux autres organismes qui sont exposés à ce produit dans un site contaminé.

De plus, la réponse génétique utilisée dans le biocapteur est souvent conservée par l'évolution chez d'autres espèces, même eucaryotes. Les protéines transporteurs d'ions métalliques, par exemple, montrent une grande homologie au niveau de leur structure comme au niveau de leur fonctionnement dans différentes espèces. Ainsi, des transporteurs de cuivre ont des homologues chez les procaryotes, comme CopA de *Enterococcus hirae* (Odermatt *et al.*, 1993) qui est proche de protéines impliquées dans la maladie de Menkes (MNK ; Vulpe *et al.*, 1993) et de Wilson (WND ; Bull *et al.*, 1993) chez l'homme. Les informations que donne un biocapteur bactérien sur la quantité biodisponible d'un toxique peuvent ainsi être extrapolées à d'autres organismes, et donc aux risques de la pollution du site même. Une analyse de la teneur totale d'un polluant mène donc souvent vers une surestimation du risque provenant d'une pollution.

Les techniques classiques appliquées actuellement pour échantillonner et analyser des sols, des lixiviats ou de l'eau sont souvent chères et longues à réaliser. Ainsi, le nombre d'analyses est souvent réduit à un strict minimum. L'utilisation des biocapteurs bactériens à fusion génétique présente une alternative comme technique d'analyse à faible coût. D'une part, elle donne des informations sur des polluants spécifiques présents dans un échantillon, d'autre part, les biocapteurs permettent une bonne approximation du risque d'un contaminant et la possibilité d'une bioremédiation (Billard et DuBow, 1998).

En particulier, les biocapteurs bactériens à gènes rapporteurs luminescents ou fluorescents (non-destructifs) permettent des mesures faciles, précises et rapides. Ces mesures peuvent être réalisées en temps réel avec un délai relativement court. L'utilisation de fibres optiques permet des mesures à distance. L'omniprésence des bactéries dans quasiment tous les environnements et l'existence des dispositifs de mesure portables est favorable à l'application d'un essai biologique *in situ* avec les microorganismes adaptés.

Un grand nombre de biocapteurs à fusion génétique a été développé récemment chez *E. coli* et d'autres espèces. L'existence d'une telle batterie de réponses génétiquement programmées qui sont inductibles par des composés chimiques a permis la création de clones pour mesurer une grande variété de substances. Comme présenté en tableau 6, un grand nombre de polluants environnementaux problématiques, de nature organique ou inorganique, peut être détecté dans des échantillons ou surveillé en temps réel dans des effluents.

De plus, la technique du biocapteur bactérien s'avère sensible pour la détection des polluants. Par exemple, sur base d'une fusion *xylR::lux* (Willardson *et al.*, 1998), la limite de détection de toluène est de 10 μM , le mercure peut être détecté avec une fusion plasmidique *mer::lux* chez *E. coli* à partir de 0,03 nM (Rasmussen *et al.*, 1997). Selon la directive européenne 80-778 (relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine), la valeur seuil de mercure dans l'eau potable est de 5 nM. Ainsi, ce dernier biocapteur présente une sensibilité suffisante pour la surveillance de la qualité de l'eau potable.

Toutefois, la conception des biocapteurs bactériens s'avère délicate et nécessite une connaissance approfondie du système biologique utilisé. La reproductibilité dépend de l'état physiologique des cellules bactériennes. Ces systèmes présentent en outre des problèmes de stabilité et de calibrage. Cependant, c'est une technologie en plein essor et les informations qui peuvent être recueillies à l'aide des biocapteurs bactériens (biodisponibilité) permettent de compléter les données fournies par les analyses classiques.

Fusion	Substance	Organisme	Référence
<i>pbrA::lux</i>	Pb	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Corbisier <i>et al.</i> , 1999
<i>copSRA</i>	Cu	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Corbisier <i>et al.</i> , 1999
<i>mer::lux</i>	Hg	<i>Escherichia coli</i>	Selifonova <i>et al.</i> , 1993
<i>mer::lux</i> <i>mer::gfp</i>	Hg	<i>Pseudomonas putida</i>	Hansen et Sorensen, 2000
<i>chr::lux</i>	Cr	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Peitzsch <i>et al.</i> , 1998
<i>cnrYXH::lux</i>	Co, Ni	<i>Ralstonia eutropha</i>	Tibarzawa <i>et al.</i> , 2000 Tibarzawa <i>et al.</i> , 2001
<i>celF::lux</i>	Ni, Co	<i>Escherichia coli</i>	Guzzo et DuBow, 1994b
<i>smt::lux</i>	Zn, Cu, Cd	<i>Synechococcus</i>	Erbe <i>et al.</i> , 1996
<i>cadC::luc</i>	Cd, Pb, Zn, Sb	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Tauriainen <i>et al.</i> , 1998
<i>cadA::lux</i>	Zn, Cd, Pb, Bi	<i>Staphylococcus aureus</i>	Corbisier <i>et al.</i> , 1993
<i>zntA::lux</i>	Cd, Hg, Pb, Zn	<i>Escherichia coli</i>	Riether <i>et al.</i> , 2000
<i>fliC::lux</i>	Al, Cu, Fe, Ni	<i>Escherichia coli</i>	Guzzo <i>et al.</i> , 1991
<i>mtu::luc</i>	Métaux lourds	<i>Aedes albopictus</i>	Klimowski <i>et al.</i> , 1996
<i>gutS::lux</i>	Sélénite, tellurite	<i>Escherichia coli</i>	Guzzo et DuBow, 2000
<i>arsB::lux</i>	Arsénite	<i>Escherichia coli</i>	Cai et DuBow, 1996
<i>ars::luc</i>	Arsénite, Arsénate, Antomoinite, Cd, Zn	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Tauriainen <i>et al.</i> , 1997
<i>narG::lux</i>	Nitrate	<i>Escherichia coli</i>	Prest <i>et al.</i> , 1997
<i>phoA::lux</i>	Phosphates	<i>Escherichia coli</i>	Riether <i>et al.</i> , 2000
<i>alx::lacZ</i>	Alcalinité	<i>Escherichia coli</i>	Bingham <i>et al.</i> , 1990
<i>tfd::lux</i>	Dérivés de phénol chlorés	<i>Ralstonia eutropha</i>	Hay <i>et al.</i> , 2000
<i>nah::lux</i>	Naphthalene	<i>Pseudomonas putida</i>	Burlage <i>et al.</i> , 1990
<i>todX::lux</i>	Benzene, toluene, ethylbenzene, xylene	<i>Pseudomonas putida</i>	Applegate <i>et al.</i> , 1998
<i>xylR::lux</i>	Benzène, toluène, xylènes	<i>Pseudomonas putida</i>	Willardson <i>et al.</i> , 1998
<i>fcba::lux</i>	p-chlorobenzoic acid	<i>Escherichia coli</i>	Rozen <i>et al.</i> , 1999
<i>bphA::lux</i>	Biphényles polychlorés	<i>Ralstonia eutropha</i>	Layton <i>et al.</i> , 1998
<i>tet::lux</i>	Tétracyclines	<i>Escherichia coli</i>	Hansen et Sorensen, 2000
<i>hbpC::lux</i>	2-hydroxybiphényle	<i>Pseudomonas azelaica</i>	Jaspers <i>et al.</i> , 2000
<i>dmpK::lacZ</i>	Phénols	<i>Escherichia coli</i>	Wise et Kuske, 2000
<i>alkB::lux</i>	Alcanes	<i>Escherichia coli</i>	Sticher <i>et al.</i> , 1997
<i>ipb::lux</i>	Hydrocarbures	<i>Escherichia coli</i>	Selifonova et Eaton, 1996
<i>nahG::lux</i>	Hydrocarbures	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Heitzer <i>et al.</i> , 1998
<i>fabA::lux</i>	Acides gras	<i>Escherichia coli</i>	Belkin <i>et al.</i> , 1997
<i>katG::lux</i> <i>micF::lux</i>	Stress oxydatif	<i>Escherichia coli</i>	Belkin <i>et al.</i> , 1996
<i>soi::lacZ</i>	Stress oxydatif	<i>Escherichia coli</i>	Kogoma <i>et al.</i> , 1988
<i>uspA::lux</i> <i>grpE::lux</i>	Stress chimique générale	<i>Escherichia coli</i>	Van Dyk <i>et al.</i> , 1995
<i>sfiA(sulA)::lacZ</i>	Mutagènes	<i>Escherichia coli</i>	Quillardet <i>et al.</i> , 1982
<i>recA::lux</i>	Mutagènes	<i>Escherichia coli</i>	Min <i>et al.</i> , 1999
<i>uvrA::lux</i> <i>alkA::lux</i>	Mutagènes	<i>Escherichia coli</i>	Vollmer <i>et al.</i> , 1997

Tableau 6 : Exemples de fusions génétiques pour la détection des différents polluants.

III. Objectifs du projet de thèse

Depuis quatre ans, le laboratoire de “Microbiologie” de l’EBSE a développé une nouvelle thématique de recherche axée sur l’étude de la réponse de biocapteurs bactériens à des polluants environnementaux métalliques. Le mercure et *Escherichia coli* ont été respectivement choisis comme métal polluant et bactérie modèles. C’est dans ce cadre que le travail de thèse a été initié. Il comportait deux objectifs principaux :

D’une part, nous avons recherché de gènes chromosomiques chez *E. coli* dont l’expression est inductible par le mercure. En effet, plusieurs espèces procaryotes ont développé un système de résistance contre cet élément. Ce système, l’opéron *mer*, existe chez *E. coli* sur un plasmide (Silver et Misra, 1988). Comme aucun système de résistance au mercure basé sur des gènes chromosomiques n’était connu chez *E. coli* au début de cette étude, nous avons décidé de rechercher des gènes dont l’expression était régulée par le mercure. La stratégie utilisée pour cela a consisté à cribler une banque de fusions transcriptionnelles réalisées par transposition du phage Mud11ac chez *E. coli* en présence du mercure, et d’isoler et identifier les gènes répondant au mercure.

D’autre part, nous avons élaboré un biocapteur bactérien répondant au mercure basé sur la réponse génétique préalablement identifiée. En effet, on manque actuellement de moyens pour évaluer rapidement et précisément la teneur biodisponible en mercure ou, plus généralement, en métaux lourds dans des échantillons environnementaux. Un biocapteur bactérien aux métaux lourds est donc susceptible d’apporter un remède à ce problème. Le biocapteur bactérien envisagé dans cette étude est basé sur une fusion génétique de la région promotrice du gène isolé de la première partie du travail avec les gènes rapporteurs *luxCDABE* de *Vibrio fischeri*. Cette fusion est portée sur un plasmide capable de se maintenir dans *E. coli* et émet un signal luminescent lorsque la bactérie rapporteur est mise en contact avec des métaux lourds. Ensuite, un test de bioluminescence est mis au point à l’aide de cette souche rapporteur. Il comprend une évaluation des facteurs influençant la réponse luminescente du système biologique utilisé afin d’optimiser l’essai sur des critères de sensibilité et de reproductibilité. Enfin, le biocapteur sera utilisé pour des applications préliminaires sur des échantillons naturels.

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

I. Souches, Plasmides, Phages

Les géotypes et l'origine des souches bactériennes utilisées au cours de cette étude sont présentés dans le tableau 7.

Souches	Caractéristiques	Références
<i>E. coli</i> BU1381	Double lysogène pour Mucls62, Mud1	Casadaban et Cohen, 1979
<i>E. coli</i> MC4100	F ⁻ , <i>araD139</i> , $\Delta(lacIPOZYA)u169$, <i>strA</i> , <i>thi</i> , <i>flb</i>	Casadaban et Cohen, 1979
<i>E. coli</i> HG7	Dérivé de MC4100, <i>zntA::lacZ</i> , Amp ^R	Cette étude
<i>E. coli</i> HG4	Dérivé de MC4100, <i>mgtA::lacZ</i> , Amp ^R	Cette étude
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, ($\phi 80lacZ \Delta M15$), $\Delta lacX74$, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ , <i>nupG</i> , <i>rpsL</i>	Life Technologies
<i>E. coli</i> SJB123	Dérivé de MG1655, <i>zntA</i> ⁻ , Cm ^R , Tet ^R , <i>recA::Tn10</i>	Beard <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> SJB124	Dérivé de MG1655, Tet ^R , <i>recA::Tn10</i>	Beard <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> MG1655	F ⁻ (Souche sauvage)	Jensen, 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DF57	Souche sauvage, Cm ^R	Kragelund <i>et al.</i> , 1997

Tableau 7 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Les plasmides utilisés lors de ce travail sont référencés dans le tableau suivant.

Plasmides	Caractéristiques	Références
pBR322	Amp ^R , Tet ^R	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pSJB07	dérivé de pACYC177, Amp ^R , <i>zntA</i> ⁺	Beard <i>et al.</i> , 1997
pHG18	pBR322, <i>zntA::lacZ</i> , Amp ^R	Cette étude
pXW1	<i>lacZ</i>	Chen <i>et al.</i> , 1992
pUCD615	<i>luxCDABE</i> , Amp ^R , Km ^R	Rogowsky <i>et al.</i> , 1987
pZNT::lux	pUCD615, <i>zntA::luxCDABE</i> , Amp ^R , Km ^R	Cette étude

Tableau 8 : Caractéristiques des plasmides utilisés dans cette étude.

II. Composés chimiques, milieux et conditions de culture

Les principaux composés chimiques utilisés lors de cette étude proviennent de chez Merck, Fluka, Sigma ou Prolabo et ils ont une pureté analytique.

Les souches bactériennes sont cultivées en milieu riche ou en milieu synthétique à 37°C en aérobiose, sur un agitateur rotatif à 150-300 tr/min dans des tubes d'Erlenmeyer ou des éprouvettes stérilisées. La souche *E. coli* HG7 est cultivée à 30°C. La croissance cellulaire est suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm (A_{600}).

Les milieux gélosés contenaient 1,5% d'agar et la croissance sur boîtes de Pétri est menée dans une étuve tempérée.

Milieux riches (pour 1 litre) :

Milieu Luria Bertani (LB)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g

Bouillon Nutritif (BN)

Bouillon nutritif (BioMérieux)	20 g
--------------------------------	------

Le mélange est dissout dans de l'eau déminéralisée et le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH avant autoclavage.

Milieux Minima (pour 1 litre) :

Milieu Glycérol-Glycérophosphate (GIGM)

Glycérol	5 g
MOPS	8,4 g
NH ₄ Cl	1 g
KCl	1 g
K ₂ SO ₄	0,87 g
CaCl ₂	0,01 g

Milieu Glucose-Glycérophosphate (GGM)

Glucose	5 g
MOPS	8,4 g
NH ₄ Cl	1 g
KCl	1 g
K ₂ SO ₄	0,87 g
CaCl ₂	0,01 g

Le pH des solutions est ajusté à 7,0 (KOH) sauf si autrement indiqué. Après autoclavage, les milieux sont supplémentés par des solutions de MgCl₂, de glycérophosphate de sodium et des oligo-éléments stérilisés préalablement par filtration.

MgCl ₂ (1 M)	1 ml	<u>Oligo-éléments</u> (100 ml)
Na-β-glycérophosphate (1 M)	5 ml	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O 37 mg
Oligo-éléments	0,1 ml	H ₃ BO ₃ 247 mg
		CoCl ₂ 39 mg
		CuSO ₄ 25 mg
		MnCl ₂ 101 mg
		ZnSO ₄ 29 mg

Les deux milieux (GGM et GlGM) sont adaptés du milieu GGM décrit par Poole *et al.* (1989). Le milieu avec glycérol comme source de carbone est utilisé pour déterminer la CMI des souches sensibles aux métaux lourds. Le milieu avec glucose est utilisé pour les essais de bioluminescence.

Milieu MN (Ben Israel *et al.*, 1998)

MOPS	8 g	Ajuster le pH à 6,9 avec NaOH
NaCl	10 g	
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,15 g	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g	

Les milieux sélectifs sont supplémentés avec les antibiotiques, et les milieux de détection avec le substrat X-Gal aux concentrations finales suivantes :

Antibiotiques :	Ampicilline (50 µg/ml)
	Kanamycine (30 µg/ml)
	Chloramphénicol (25 µg/ml)
	Tétracycline (10 µg/ml)
Substrat de la β-galactosidase :	X-Gal 4% (p/v)

III. Construction de la banque de fusions transcriptionnelles

Des fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *lacZ* sont créées *in vivo* dans l'ADN génomique d'*Escherichia coli* de façon aléatoire en utilisant les propriétés de transposition du bactériophage Mud1*lac*. Le protocole utilisé est une modification des méthodes de Casadaban et Cohen (1979) et de Miller (1992).

III.1. Préparation du lysat phagique

Le lysat de *Mud1lac* est préparé avec la souche *E. coli* BU1381 qui contient le prophage *Mud1lac* qui est défectif (incapable de lyser la cellule hôte) et le prophage *Mucts62* qui possède une mutation thermosensible (*cts62*) dans le répresseur de la lyse et qui sert de phage helper pour l'encapsidation de *Mud1lac*. Ainsi, lorsque BU1381 est cultivé à une température supérieure à 38°C la phase lytique est induite et les deux prophages sont alors encapsidés et libérés dans le milieu.

Une préculture de BU1381 est ensemencé au 1/20 dans du milieu LB frais et on laisse les cellules se développer à 30°C jusqu'à $A_{600}=0,3$. Ensuite, la température de la culture est augmentée à 45°C pendant 5 min. Après la culture est incubée à 42°C pendant 20 min et puis à 37°C pendant 60 min. La culture (10 ml) est supplémentée de 5 gouttes de CHCl_3 et centrifugée à 5000 g pendant 10 min. Le surnageant (lysate) est récupéré et stocké à 4°C.

III.2. Infection

1 ml d'une culture fraîche de la souche réceptrice MC4100 ($A_{600}=0,2$) est infecté avec respectivement 50 μl et 200 μl du lysat phagique obtenu précédemment (paragraphe III.1.). Ces mélanges d'infection sont supplémentés de MgSO_4 et de CaCl_2 afin d'obtenir des concentrations respectivement de 2 mM et 1 mM et on laisse les phages s'adsorber à température ambiante pendant 15 min. Ensuite, les tubes sont agités à 30°C pendant 30 min. Enfin, les mélanges d'infection sont dilués au 1/10 dans du milieu LB frais et 0,1 ml de chaque dilution est étalée sur boîtes de Pétri contenant du LB avec de l'ampicilline et du X-Gal. Les boîtes sont incubées pendant 48 h à température ambiante.

Les colonies bactériennes de couleur bleu très clair jusqu'à très foncé, toujours dépendant du niveau d'expression de *lacZ* sont récupérées. De cette manière, on a pu sélectionner environ 7500 clones. Les clones de cette banque sont repiqués sur une boîte matrice pour le criblage.

III.3. Criblage de la banque

Pour sélectionner des clones répondant à la présence de mercure, la banque est transférée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé supplémenté avec de

l'ampicilline et du X-Gal, dans lequel du HgCl₂ est ajouté à des concentrations respectives de 0 ppm (témoin), 0,1 ppm, 1 ppm, et 10 ppm. Ces boîtes sont incubées pendant 40 heures à température ambiante. Ensuite, les clones qui présentent une variation de la coloration en fonction de la concentration en HgCl₂ ajoutée sont sélectionnés et isolés comme candidats potentiels portant une fusion génétique entre un gène chromosomique, qui est affectée par la présence de mercure et le gène rapporteur *lacZ*.

IV. Techniques de biologie moléculaire

Les techniques les plus couramment utilisées telles que le dosage de l'ADN, la préparation et la digestion des plasmides, les électrophorèses sur gel d'agarose sont également décrites dans le manuel de laboratoire Sambrook *et al.* (1989).

IV.1. Extraction d'ADN

IV.1.1. Extraction d'ADN chromosomique

Une culture bactérienne d'environ 16 h dans du milieu LB est centrifugée à 4000 g pendant 15 min et le culot est repris dans 1,4 ml de TE 10x. Le mélange est complété avec 200 µl de SDS et 800 µl de RNaseA, puis incubé pendant 2 h à 37°C. Ensuite, 400 µl de pronase sont ajoutés et le mélange est incubé à 37°C pendant 2 h supplémentaires. Trois étapes d'extraction suivent ce traitement enzymatique : une extraction avec 1 volume de phénol, et deux extractions avec 1 volume de phénol/CHCl₃. La solution résultante est mélangée avec 1 volume d'isopropanol afin de précipiter l'ADN. Le précipité est lavé dans de l'éthanol à 70%, puis à 90% avant de le dissoudre dans 400 µl de TE 1x.

Solutions utilisées :

TE (1x)	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM
SDS	10% (w/v)
RNaseA	1 mg/ml
Pronase	20 mg/ml
Phénol/CHCl ₃	1 : 1 (v/v)

IV.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

10 ml d'une culture en milieu LB sélectif d'environ 16 h sont centrifugés pendant 5 min à 5000 g. Le culot est repris dans 200 µl d'eau et on y ajoute 400 µl de solution II. Ce mélange est incubé pendant 4 min sur glace avant d'ajouter 300 µl de solution III glacée. Le mélange est vortexé vigoureusement et placé sur glace pendant 5 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12000 g pendant 5 min. Ensuite, l'ADN est purifié par une extraction au phénol/CHCl₃ et de CHCl₃, et il est précipité par l'ajout de 600µl d'isopropanol. Après centrifugation à 12000 g pendant 5 min, le culot est lavé avec de l'éthanol 70% et dissout dans 50 µl de TE avec 5µl de RNase (10 mg/ml).

Solutions utilisées :

Solution II 0,2 M NaOH, 10% SDS

Solution III Acétate de potassium 3 M pH 4,8 (60 ml Acétate de potassium 5M ;
11,5 ml acide acétique glaciale; 28,5 ml d'eau).

IV.1.3. Purification d'un fragment d'ADN

Cette méthode permet de purifier des fragments d'ADN contenus dans un gel d'agarose provenant d'une hydrolyse enzymatique ou d'une PCR. Elle met en œuvre le kit GENE CLEAN (BIO 101) qui contient une matrice en silice (GLASSMILK) liant spécifiquement les ADN simple et double brins. Les bandes du gel d'agarose contenant le fragment à extraire sont découpées au scalpel et solubilisées à 50°C dans une solution de sels chaotropiques (NaI 4 M). Ensuite, l'ADN est fixé sur la matrice de silice, lavé et élué dans de l'eau stérile selon les instructions du fournisseur.

IV.2. Modifications enzymatiques de l'ADN

IV.2.1. Digestion par les endonucléases de restriction

Les conditions d'utilisation des enzymes de restriction respectent en général les recommandations des fournisseurs (Boehringer Mannheim ou MBI Fermentas). Les tampons

d'incubation assurant l'activité maximale sont fournis avec l'enzyme sous forme concentrée 10x. En principe, une unité d'endonucléase digère complètement 1 µg d'ADN en 1 h à 37°C. Cependant, la qualité de l'ADN issu des préparations nécessite généralement d'augmenter la quantité d'enzyme à 5 U/µg d'ADN et le temps d'incubation à 2 h à 37°C.

IV.2.2. Ligation de l'ADN

Les ligations des fragments d'ADN sont réalisées à l'aide de la ligase du phage T4 selon les recommandations du fournisseur (MBI Fermentas). Le mélange réactionnel pour 10 µl contient :

ADN	50-100 ng total
Tampon Ligase 10x	1 µl
T4 ADN Ligase	1 µl

Les rapports vecteur-insert utilisés sont généralement de 1 : 0, 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3. La ligation est réalisée entre 14 h et 16 h à une température de 14°C à 18°C.

IV.3. Analyse de l'ADN

IV.3.1. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse permet de séparer et d'identifier les fragments d'ADN en fonction de leur taille et leur conformation. Un gel est constitué dans du tampon non-dénaturant TAE 1x ou TBE 0,5x. Le pourcentage d'agarose varie entre 0,7% (fragments > 1 kb) et 1% (fragments < 1 kb). Après l'électrophorèse, l'ADN est visualisé par incubation du gel dans de l'eau contenant du bromure d'éthidium (BEt ; 0,5 µg/ml) pendant 10 min. Le BEt est un agent intercalant de l'ADN et fluoresce sous lumière UV.

Tampons d'électrophorèse utilisés :

<u>TAE 1x</u>		<u>TBE 0,5x</u>	
Tris-acétate	40mM	Tris-borate	45 mM
EDTA	1 mM	EDTA	1 mM

IV.3.2 Quantification de l'ADN

Méthode d'absorbance :

Les concentrations d'ADN sont déterminées par spectrophotométrie. Cette méthode repose sur la comparaison des longueurs d'onde à 280 et 260 nm. En effet, l'ADN absorbe à 260 nm, alors que les protéines présentent un spectre global avec un pic d'absorption à 280 nm. Le rapport A_{260}/A_{280} doit être compris entre 1,5 et 2 d'une solution suffisamment pure pour pouvoir quantifier l'ADN. Une unité A_{260} indique une concentration d'ADN d'approximativement 50 µg/ml.

Méthode de fluorescence :

La fluorescence du BET sous UV peut être utilisée pour quantifier l'ADN. Ceci est réalisé par migration électrophorétique de l'échantillon d'ADN et d'une série d'ADNs marqueurs de concentrations. Après coloration au BET, l'intensité de fluorescence des différentes bandes sous UV est comparée. Puisque les bandes d'intensité égale contiennent la même masse d'ADN, la quantité d'ADN peut être estimée.

IV.4. Analyse de l'ADN par hybridation (Southern Blot)

IV.4.1. Transfert d'ADN sur membrane de nylon

Les expériences d'hybridation nécessitent le transfert des fragments d'ADN d'une matrice gélifiée (gel d'agarose) sur un support solide (membrane de nylon). La technique utilisée dérive de la méthode de Southern (1975).

Après électrophorèse, le gel est laissé pendant 10 min dans une solution de dépurination (HCl 0,2 M). Ensuite, le liquide résiduel est éliminé et le gel est recouvert de la solution de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) pendant 30 min. On procède de la même manière avec la solution de neutralisation (Tris 1 M, NaCl 2 M, ajustée à pH 5 avec HCl). Le transfert est effectué par capillarité à l'aide du tampon de transfert SSC 20x (NaCl 3 M, citrate de sodium 0,3 M, pH 7). Ainsi, le gel est posé sur du papier Whatman 3 MM trempé dans la solution SSC 20x et la membrane de nylon (Membrane Nylon Zeta-Probe GT/Genomic) repose directement sur le gel. Le tout est recouvert d'une couche épaisse de papier absorbant (8 cm d'épaisseur) et aplatis avec un poids de 500g. Après 24 h de transfert à température

ambiante, l'ADN est fixé thermiquement sur la membrane par incubation à 80°C pendant 30 min.

IV.4.2. Marquage, hybridation et détection

Toutes les expériences de détection d'ADN sont réalisées en utilisant le kit "DIG DNA labelling and detection kit" de Boehringer Mannheim selon les recommandations du fournisseur. Ce kit est basé sur une méthode de détection immunologique combinée à une réaction enzymatique.

IV.4.2.1. Marquage de la sonde d'ADN

Le marquage de la sonde est effectué par amorçage aléatoire d'hexanucléotides et extension de ces amorces par le fragment de Klenow en présence d'un désoxynucléotide contenant la digoxygénine (DIG), le dUTP-11-digoxygénine, qui est ainsi incorporé dans l'ADN au hasard (random-prime labelling).

Ainsi, 15 µl d'une solution d'ADN à marquer (70 ng/µl) sont dénaturés dans de l'eau bouillante pendant 10 min, puis rapidement refroidis dans la glace. A ce mélange, 2 µl d'hexanucléotides, 2 µl de dNTPs contenant du dUTP marqué à la digoxygénine (DIG) et 1 µl de l'enzyme de Klenow sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 60 min à 37°C, puis la réaction est stoppée par l'ajout de 2 µl d'EDTA (0,2 M). L'ADN est précipité avec 2,5 µl de LiCl (4 M) et 75 µl d'éthanol absolu, centrifugé à 12000 g (10 min) et resuspendu dans 50 µl de TE 1x.

IV.4.2.2. Hybridation ADN/ADN

Dans un premier temps, la membrane de nylon est mise en contact pendant 5 min avec le tampon de préhybridation à 65°C afin de saturer les sites d'hybridation non-spécifiques. Le tampon de préhybridation est éliminé et remplacé par le même tampon contenant la sonde préalablement dénaturée pendant 10 min à 95°C (25 µl pour 15 ml de tampon), puis le tout est placé sous agitation à 65°C pendant 16 h. La membrane est lavée 2 fois à 65°C dans la solution I de lavage, puis 2 fois dans la solution II dans les mêmes conditions. Ces étapes de lavage permettent d'éliminer la sonde fixée aspécifiquement ou non fixée.

Solutions d'hybridation :

Tampon de préhybridation	Na ₂ HPO ₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS 7% (w/v)
Solution I de lavage	Na ₂ HPO ₄ 40 mM (pH 7,2), SDS 5% (w/v)
Solution II de lavage	Na ₂ HPO ₄ 40 mM (pH 7,2), SDS 1% (w/v)

IV.4.2.3. Révélation

La technique de détection fait intervenir des anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline. Cet enzyme catalyse la déphosphorylation d'un de ses substrats BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), ce qui donne un produit oxydable par le nitrobleu de tetrazolium. Cette oxydation de BCIP donne un précipité bleu-violet qui est visible sur la membrane de nylon. Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante avec agitation, excepté l'addition de substrat. Les volumes des solutions sont donnés pour une taille de membrane de 100 cm².

La membrane est lavée pendant 1 min dans du tampon I puis incubée 30 min dans du tampon II ce qui permet de masquer les sites de fixation aspécifiques de l'anticorps anti-DIG. Le tampon II est remplacé par 15 ml de solution d'anticorps diluée au 1/5000 dans le tampon II, puis la membrane est incubée pendant 30 min. Les anticorps non liés sont ensuite éliminés par 2 lavages de 15 min avec 100 ml de tampon I de lavage et la membrane est ensuite équilibrée pendant 2 min dans 20 ml de tampon III. Enfin, la membrane est incubée dans 15 ml de la solution colorante et lorsque l'intensité des bandes est assez importante, la réaction est arrêtée par l'ajout de 50 ml de tampon IV.

Solutions de révélation :

Tampon I	Acide maléique 100 mM (pH 7,5), NaCl, 150 mM
Tampon II	Réactif bloquant 10% (w/v) dans le tampon I
Tampon III	Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, MgCl ₂ 50 mM
Tampon VI	Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM
Solution colorante	solution NBT 67,5 µl, solution BCIP 52,5 µl, tampon III qsp 15 ml

IV.5. Amplification *in vitro* de fragments d'ADN (PCR)

La PCR permet l'amplification exponentielle de séquences d'acides nucléiques définies. L'hybridation d'une amorce sur la matrice d'ADN à amplifier permet la formation d'un ADN double brin (préalablement dénaturé) nécessaire à l'initiation de la réaction. Une ADN polymérase thermostable (Taq Polymérase ; Fournisseur : MBI Fermentas) sert donc à synthétiser l'ADN du brin complémentaire. Deux amorces oligonucléotidiques limitent le fragment à amplifier. La détection des amplicons se fait par migration de 5 à 10 µl du mélange PCR sur gel d'agarose (1%). Le fragment obtenu est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipitation dans de l'éthanol à 70%.

Les témoins négatifs de l'amplification contiennent tous les constituants du mélange PCR excepté l'ADN matrice. Les amorces sont fournies par la société Eurobio et leur composition nucléique est la suivante :

ZNT1 : 5'-CGGGATCCGCTCGCTGTATCTCTG-3' (souligné : site *Bam*HI)
 ZNT2 : 5'-GAGGGGAATTCTTGCCGTGATTGTC-3' (souligné : site *Eco*RI)

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume final de 50 µl contenant :

ADN matrice	50 ng
Amorces (gauche et droite, resp.)	100 ng
dNTP	200 µM
tampon PCR 10x	5 µl
MgCl ₂	2 mM
Taq polymérase	1 U.

La PCR est réalisée avec un Thermocontroller PTC-100 (MJ Research) avec le programme suivant :

- étape 1 : dénaturation totale 2 min à 95°C ;
- étape 2 : dénaturation 40 s à 95°C ;
- étape 3 : hybridation 40 s à 50°C ;
- étape 4 : polymérisation 45 s à 72°C ;
- étape 5 : les étapes 2 à 4 sont répétées sur 30 cycles ;
- étape 6 : polymérisation finale 5 min à 72°C.

IV.6. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN est réalisé à l'extérieur du laboratoire selon la méthode décrite par Sanger *et al.* (1977). L'ADN à séquencer est polymérisé à partir d'oligonucléotides s'hybridant avec cette matrice en présence de didesoxynucléotides qui stoppent la polymérisation et des désoxyanucléotides (ATP) marqués au ^{35}S permettant la détection. Les amorces utilisées sont les suivantes :

1358 : 5'-ATGCGTCCGGCGTAGA-3'

1357 : 5'-CACTATCGACTACGCGATCA-3'

Trp1 : 5'-GGCCAAACTCACCAAAATAGGG-3'

Les séquences d'ADN obtenues sont comparées avec les séquences du chromosome entier d'*E. coli* K12 disponibles dans la banque de données (GenBank) à l'aide du programme de comparaison des séquences BLASTN (Altschul *et al.*, 1990).

IV.7. Transformation bactérienne et sélection des recombinants

Deux méthodes de transformation sont utilisées au laboratoire : la méthode chimique basée sur un traitement des cellules au CaCl_2 , et la méthode par électroporation, qui permet souvent de meilleurs rendements de transformation.

IV.7.1. Transformation après traitement au CaCl_2

Les bactéries (*E. coli*) sont cultivées dans du milieu LB jusqu'à une densité optique de $A_{600}=0,4$, ensuite, elles sont concentrées par centrifugation à 4000 g pendant 5 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot de bactérie est mis doucement en suspension dans 1 volume de CaCl_2 0,1 M glacé et l'ensemble est incubé pendant 30 min sur glace. Les cellules sont à nouveau concentrées par centrifugation selon le même protocole, puis mises en suspension dans 1/50 volume de CaCl_2 0,1 M additionné de glycérol à 14%. Les cellules compétentes peuvent ainsi être conservées à -80°C.

Pour la transformation, 50 - 100 ng de plasmides sont incubés avec 200 μ l de bactéries compétentes sur de la glace pendant 30 min, suivi d'un choc thermique de 90 s à 42°C. La suspension est alors incubée pendant 45 min à 37°C en présence de 1 ml de milieu LB. Les bactéries sont ensuite concentrées par centrifugation et étalées sur des boîtes contenant le milieu de sélection approprié.

IV.7.2. Electroporation

Les souches d'*E. coli* électrocompétentes sont préparées grâce à plusieurs lavages à l'eau désionisée pour réduire la conductivité de la suspension bactérienne. Ainsi, une culture fraîche dans du LB ($A_{600}=0,5$) est concentrée par centrifugation à 5000 g pendant 5 min à 4°C, et le culot est resuspendu dans $\frac{1}{2}$ volume d'eau déminéralisée glacée contenant 10% de glycérol. Ensuite, la suspension est centrifugée dans les mêmes conditions, et cette procédure de lavage est répétée encore 2 fois. Après la dernière centrifugation, les cellules sont resuspendues dans $\frac{1}{200}$ volume d'eau déminéralisée contenant 10% de glycérol ce qui permet la congélation des bactéries électrocompétentes à -80°C.

Pour l'électroporation, 50 μ l des bactéries sont mélangées avec 30-50 ng de plasmides et incubées sur glace pendant quelques minutes. Ce mélange est placé dans des cuves d'électroporation et soumis à un choc électrique généré par un Gene Pulser (Biorad, 1,25 kV, 200 Ω , 25 μ F). Immédiatement après la décharge, les cellules sont diluées dans du LB glacé et incubées pendant 45 min à 37°C. Puis elles sont étalées sur un milieu sélectif.

Les électrocompétentes de la souche *Pseudomonas fluorescens* DF57 sont préparées selon le protocole d'Itoh *et al.* (1994). Les bactéries sont cultivées dans du LB supplémenté de 0,3% de glycérol (LBG) pendant 18 h. Cette culture est refroidie sur glace et concentrée par centrifugation (2500 g, 10 min, 0°C). Le culot est resuspendu dans un volume d'un tampon contenant 0,3 M de saccharose et 5 mM de K_2HPO_4 (pH 7). Après une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions, les cellules sont reprises dans $\frac{1}{25}$ volume du même tampon.

90 μ l de cellules électrocompétentes sont mélangés avec 10 μ l de plasmide (20-40 ng/ μ l) et incubés sur de la glace dans une cuve d'électroporation (0,1 cm de distance entre les électrodes) pendant 1 min. Les cellules sont soumises à un décharge électrique (1,8 kV, 200 Ω , 25 μ F) et diluées dans 1 ml de milieu LBG à 4°C. Ensuite, les bactéries sont incubées à 30°C pendant 1 h et étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de sélection approprié.

V. Dosage de l'activité β -galactosidase

Pour quantifier l'expression génétique de la fusion *zntA::lacZ* des souches HG7 et DH10B/pHG18, l'activité β -galactosidase présent dans les cellules est dosée selon un protocole modifié de Miller (1992).

Pour doser l'activité β -galactosidase, les cellules doivent être lysées afin de libérer l'enzyme. La β -galactosidase hydrolyse un substrat chromogène, l'ONPG (ortho-nitrophénol- β -D-galactopyranoside) préalablement ajouté, ce qui génère une coloration jaune qui est quantifiable par spectrophotométrie. Ainsi, une suspension bactérienne, dont la densité optique (A_{600}) et le volume (0,2-0,5 ml) sont déterminés, est ajoutée dans un tampon Z à un volume final de 1 ml. Ce tampon est additionné d'une goutte de SDS (0,1%) et de deux gouttes de CHCl_3 puis vortexé pendant 10 s pour lyser les cellules. La réaction est déclenchée par l'addition de 0,2 ml d'ONPG, le mélange est ensuite incubé à 28°C jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. La réaction est stoppée par l'ajout de 0,5 ml de Na_2CO_3 et le temps de la réaction est chronométré. Ensuite, la coloration jaune est quantifiée par mesure de l'absorption à 420 nm et à 550 nm pour le facteur correctionnel dû aux débris cellulaires.

L'activité de la β -galactosidase en Unités Miller (Miller, 1992) se calcule selon la formule suivante :

$$\text{Unités } \beta\text{-gal} = 1000 \cdot (A_{420} - 1,75 \cdot A_{550}) / (t \cdot V \cdot A_{600}) \quad , \text{ dont } t = \text{temps de réaction [min]}$$

$$V = \text{volume de culture [ml]}$$

Les solutions nécessaires au dosage de la β -galactosidase sont indiquées ci-dessous :

Tampon Z (pH 7,0)	Na_2HPO_4	0,06 M
	NaH_2PO_4	0,04 M
	KCl	0,01 M
	MgSO_4	0,001 M
ONPG		4 mg/ml
Na_2CO_3		1 M

Le β -mercaptoéthanol est omis du tampon Z pour éviter les précipitations des métaux lourds dans le mélange réactionnel, ce qui peut fausser les absorptions à 420 nm et à 550 nm.

V.1. Dosage sur boîte de Pétri

Pour ce dosage, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé (ampicilline) contenant 0 ppm, 1 ppm ou 10 ppm de HgCl_2 . Les boîtes sont incubées pendant une nuit à 30°C. La couche bactérienne qui s'est développée à la surface est raclée et récupérée par pipetage avec quelques ml de LB frais.

V.2. Cinétique en milieu liquide

Une culture de nuit dans du bouillon nutritif (BN + ampicilline) estensemencée au 1/100 dans du BN frais, et cette culture est incubée à 30°C jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance ($A_{600}=0,1$). Ensuite, la culture est aliquotée dans plusieurs récipients stérils à des volumes identiques, et les solutions des métaux lourds sont ajoutées selon les objectifs du test. L'activité enzymatique de la β -galactosidase est dosée sur des échantillons prélevés des différentes cultures à des intervalles de temps distincts.

VI. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Des précultures dans du LB des différentes souches d'*E. coli* sontensemencées au 1/100 dans du milieu GIGM (Glycérol-glycérophosphate médium) sans ajout d'antibiotiques, de façon à obtenir une A_{600} de l'ordre de 0,05. Les milieux sont ensuite répartis dans différents tubes contenant des quantités définies de métal. Les cultures sont incubées sous agitation pendant 24 h à 37°C. Ensuite, la densité optique à 600 nm (A_{600}) est mesurée pour chaque culture afin de déterminer la survie des cellules. La CMI est définie comme la plus faible concentration en métaux lourds qui inhibe un développement bactérien (supérieur à $A_{600}=0,05$).

VII. Mesures de luminométrie

VII.1. Généralités

Les mesures luminométriques sont effectuées à l'aide d'un luminomètre Lumistar (BMG LabTechnologies). Ces expériences sont conduites dans des microplaques blanches opaques à 96 puits.

180 μ L de culture bactérienne sont ajoutés dans une microplaque et mélangés avec 20 μ l d'une solution métallique aqueuse concentrée 10 fois. Ces mélanges sont préparés immédiatement avant la mesure et placés dans le luminomètre. La luminescence des suspensions bactériennes est mesurée après des intervalles de temps réguliers (30 min ou 20 min).

Les conditions de mesure sont les suivantes :

Température :	30°C
Temps d'intégration :	10 s
Gain :	compris entre 70 et 90%,

Les résultats sont présentés en unités relatives de luminescence, ou alternativement, les facteurs d'induction sont calculés comme le rapport entre la luminescence d'une culture induite par les métaux lourds et celle de la culture témoin, préparée de la même manière sans ajout de métal inducteur.

Les résultats présentés sont des moyennes calculées à partir d'au moins deux mesures indépendantes réalisées en double, sauf si autrement indiqué. Les barres d'erreur représentent les écarts types par rapport à la moyenne.

VII.2. Préparation des cultures pour le bioessai

VII.2.1. Les mesures dans du milieu LB

Pour les mesures dans du milieu LB, une préculture des souches rapporteurs de 16 h à 20 h à 37°C dans du milieu LB supplémenté d'ampicilline et de kanamycine estensemencée au 1/100 dans le même milieu. Cette culture a ensuite été incubée à 37°C et la croissance est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm jusqu'au début de la phase exponentielle de

croissance. Les densités optiques des cultures utilisées sont indiquées dans les légendes des figures respectives.

VII.2.2. Les mesures dans du milieu MN

Les résultats présentés correspondent à la moyenne de la mesure réalisée en double. Les barres d'erreur ne sont donc pas présentées, mais l'intervalle d'erreur ne dépasse en aucun cas un intervalle de 10%. Ces mesures ne sont donc pas spécifiques mais les résultats nous ont indiqué des tendances pour l'évaluation des conditions d'essai afin de pouvoir les optimiser.

Les mesures réalisées dans du milieu MN ont demandé une préparation de culture particulière, car le milieu MN ne permet pas un développement cellulaire. Les cellules sont donc cultivées dans du milieu LB avant de les ajouter dans le milieu MN. La culture dans du LB estensemencée au 1/100 le jour de la mesure à partir d'une préculture de nuit. Deux protocoles de culture différents sont appliqués :

VII.2.2.1. Par centrifugation

Les cellules sont cultivées dans du milieu LB additionné d'antibiotiques jusqu'à une densité optique de $A_{600}=0,1$ à 37°C. Les cellules ont ensuite été concentrées par centrifugation à 3000 g pendant 3 min à température ambiante. Le surnageant est jeté et le culot est lavé doucement avec du MN à température ambiante. Ensuite, les cellules sont reprises dans du milieu MN à la densité optique de $A_{600}=0,05$.

VII.2.2.2. Par dilution

Ce protocole est adapté de Ben-Israel *et al.* (1998). Une culture dans du milieu LB (37°C ; ampicilline, kanamycine) à une densité optique de $A_{600}=0,2$ est diluée à moitié avec du milieu LB frais. Cette suspension bactérienne est diluée ensuite au 1/10 dans du MN à température ambiante. La culture résultante a une densité optique de $A_{600}=0,01$.

VII.2.3. Les mesures dans du milieu GGM

VII.2.3.1. Mesures préliminaires

Les mesures préliminaires sont effectuées à partir de cultures bactériennes dans du milieu GGM additionné d'ampicilline. Ces cultures sontensemencées directement au 1/50 à partir d'une préculture dans du milieu LB en phase stationnaire (16 - 20 h, 37°C). Pour les mesures luminométriques, les cultures sont incubées à 37°C jusqu'à une $A_{600}=0,2$ avant de démarrer la mesure. Les temps d'incubation ont varié entre 2 et 4 h pour atteindre la densité optique d'essai.

VII.2.3.2. Protocole standard

Pour les mesures suivantes, ce protocole de préparation de cellules est modifié de façon à obtenir des conditions de mesure plus stables.

Une préculture dans 20 ml de milieu LB supplémenté de kanamycine et ampicilline est incubée pendant 20 h sous agitation rotative (200 tr/min) dans un flacon Erlenmeyer de 100 ml à 37°C. Les cellules sont concentrées par centrifugation (6000 g, 5 min, 22°C) et le culot est repris dans du LB frais tempéré à 30°C. La densité optique est ajustée à $A_{600}=10$, sauf si autrement indiqué dans la légende des figures. Ensuite, cette culture est diluée au 1/50 dans du milieu GGM (pH 6,5) additionné d'ampicilline préalablement tempéré à 30°C. La densité optique finale est de $A_{600}=0,2$.

VII.2.3.3. Mesure de l'influence de la phase de croissance

Pour évaluer l'influence de la phase de culture sur la réponse de la souche rapporteur, les cellules sont cultivées comme précédemment décrit dans le paragraphe VII.2.3.2. et, après centrifugation, elles sont reprises dans du LB à $A_{600}=2,5$ et diluées ensuite au 1/50 dans du milieu GGM pour atteindre une densité optique de $A_{600}=0,05$. Cette culture est incubée à 37°C sous agitation, et le temps d'incubation est chronométré. Immédiatement après dilution (0 h), et après des temps d'incubation respectivement de 2 h, 4 h et 7 h, des aliquots sont prélevés et incubés dans une microplaque avec du CdCl_2 (0,3 μM), du HgCl_2 (3 μM), du $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (1 μM) et du ZnSO_4 (10 μM) pendant 3 h. Les résultats présentés correspondent au maximum d'induction selon le délai d'incubation indiqué.

VII.2.3.4. Mesure de l'influence de la densité cellulaire

L'influence de la densité cellulaire sur la réponse est déterminée en ajustant les densités optiques dans du LB après l'étape de centrifugation du protocole décrite dans le paragraphe VII.2.3.2. Les densités optiques sont respectivement $A_{600}=2,5$; 5 ; 10 ; 25 ; 50. Ces cultures sont diluées au 1/50 dans du milieu GGM et incubées avec les métaux inducteurs (CdCl_2 0,3 μM , HgCl_2 3 μM , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1 μM , ZnSO_4 10 μM) pendant 3 h et la luminescence est mesurée toutes les 20 min.

VII.2.3.5. Mesure de l'influence du pH

La réponse de la souche rapporteur en fonction des différents pH est évaluée en utilisant le protocole standard et des milieux GGM dont le pH est modifié avant l'autoclavage des milieux. Les pH des milieux sont respectivement de 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5. Le temps d'incubation avec les métaux lourds (CdCl_2 0,3 μM , HgCl_2 3 μM , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1 μM , ZnSO_4 10 μM) de 80 min est commun pour toutes les cultures.

VII.2.3.6. Mesure de la luminescence en présence de plusieurs métaux

Cet essai est effectué selon le protocole standard. 180 μl de la culture sont ajoutés dans la microplaque et mélangés avec 20 μl d'une solution métallique concentrée 10 fois par rapport aux concentrations finales ou avec 10 μl de deux métaux respectives (20 fois concentrés par rapport aux concentrations finales). La luminescence après 80 min d'incubation est présentée. Pour cette mesure, une seule culture est utilisée et séparée en triplicat. Les valeurs présentées indiquent ainsi la moyenne des trois mesures.

VII.2.3.7. Mesure de la luminescence en présence de chélateurs

180 μl d'une culture de MG1655/pZNT::lux sont préparés selon le protocole standard et incubés avec 10 μl des solutions de métaux lourds concentrés 20 fois par rapport aux concentrations finales de 10 μM de CdCl_2 et de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Ensuite, 10 μl des solutions aqueuses des substances chélateurs Na_2S et EDTA sont ajoutés pour donner les concentrations finales suivantes : 0 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM et 20 μM . En absence de métaux, les

concentrations finales en EDTA et Na_2S sont ajoutées comme indiqué dans la figure. Le temps d'incubation est généralement de 80 min.

VII.2.3.8. Analyse d'échantillons environnementaux

Pour mesurer la luminescence de la souche rapporteur en présence de sols et des lixiviats, les cultures sont préparées selon le protocole standard. Dans des microplaques, de 10 à 20 mg de sols sont mélangés avec 200 μl de la culture bactérienne. Les lixiviats sont ajoutés par aliquots de 20 μl dans 180 μl de culture dans la microplaque et les mélanges sont incubés pendant 80 min.

VIII. Préparation des échantillons environnementaux

VIII.1. Préparation et conditionnement des sols

Les sols utilisés dans ce travail sont un sol non-contaminé, nommé sol standard, provenant d'une prairie de la région messine, et deux sols contaminés, nommés S1 et S3, fournis par l'IRH à Nancy. Ils sont tamisés (< 2 mm) et séchés à température ambiante pendant plusieurs jours. Les sols sont stockés à l'obscurité à température ambiante dans des récipients en polyéthylène fermés. L'analyse des sols est présentée en annexe.

Pour enrichir le sol standard en métaux lourds, 1 g de sol est placé dans un tube en polyéthylène (10 ml) et 0,1 ml d'une solution de CdCl_2 , HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de ZnSO_4 dans de l'eau déminéralisée est ajouté. Les concentrations des métaux dans la solution à appliquer sur le sol et la teneur finale dans le sol sont présentées dans le tableau 9.

Les mélanges sont broyés à l'aide d'une spatule et mis en agitation rotative (450 tr/min) pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain, le sol collé sur les parois des tubes est raclé vers le fond et les tubes fermés sont incubés pendant 3 jours. Ensuite, les sols sont mélangés et séchés en ouvrant les tubes à température ambiante pendant 4 jours. Les sols sont mélangés régulièrement avec une spatule.

Concentrations en métaux lourds dans la solution de contamination [mM]	Concentrations finales de métaux lourds dans le sol [$\mu\text{mol/g}$ matière sèche]
0	0
0,01	0,001
0,1	0,01
1	0,1
10	1

Tableau 9 : Concentrations des solutions utilisées pour contaminer les sols et la teneur finale correspondant.

VIII.2. Préparation des lixiviats

Les lixiviats des sols sont préparés selon les recommandations de la norme AFNOR X31-210. Ainsi, 0,1 g des sols est placé dans un tube en polyéthylène (10 ml) et mélangé avec 1 ml d'eau déminéralisée. Les tubes sont fermés et agités à l'horizontale pendant 24 h à température ambiante. Les suspensions de sols ont ensuite été versées dans des tubes Eppendorf et centrifugées à 12000 g pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et utilisé directement dans l'état.

CHAPITRE III :

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Isolement d'un clone répondant au mercure

L'étape initiale de ce travail consistait à identifier, chez *Escherichia coli*, des gènes dont l'expression est régulée par la présence de métaux lourds, dont le mercure. Cet organisme a été choisi d'une part, car on dispose de nombreuses informations sur sa physiologie, facilitant la mise en œuvre de manipulations *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'interprétation des résultats. D'autre part, le génome de la bactérie est entièrement séquencé, ce qui facilite l'identification de gènes dont on ignore la fonction exacte.

La stratégie utilisée s'appuyait sur la création d'une banque de fusions transcriptionnelles à partir de la souche *E. coli* MC4100 (*lac*⁻) et du phage Mud1*lac*. Ce phage porte dans son ADN une copie du gène *lacZ* dépourvu de ses séquences régulatrices (Casadaban et Cohen, 1979). Au cours de l'infection, Mud1*lac* s'intègre spontanément et aléatoirement dans le génome de la bactérie hôte, pouvant créer une fusion transcriptionnelle en une seule étape.

Le criblage de la banque est réalisé sur un milieu contenant du mercure. Ce métal lourd est choisi comme modèle en raison de sa toxicité élevée et ses effets négatifs sur la physiologie cellulaire (Narbonne, 1996). De plus, chez *E. coli*, aucun gène chromosomique de résistance au mercure n'était connu au début de l'étude. En effet, l'opéron *mer*, qui confère la résistance au mercure de cet organisme, est identifié sur un plasmide (Summers, 1986 ; Walsh *et al.*, 1988).

I.1. Criblage de la banque de fusions transcriptionnelles

En infectant une culture d'*Escherichia coli* MC4100 avec Mud1*lac* nous avons obtenu une banque de 7500 clones, dont chacun contient une copie de *lacZ* intégré de façon aléatoire dans son génome. Afin d'évaluer la représentativité de cette banque, les paramètres suivants ont été calculés :

Le taux de transduction obtenu pour cette banque est de l'ordre de 10^{-4} , la valeur correspond à une efficacité d'infection (nombre de phages nécessaire à l'obtention d'un transductant) normale (Miller, 1992).

Le taux de fusions (pourcentage de colonies bleues après 24 h d'incubation à 30°C) est de l'ordre de 30%. En tenant compte du fait que le génome contient 4288 gènes potentiels (Dougan *et al.*, 2001) dont un certain nombre de gènes essentiels et des régions non-codantes, on peut dire que la banque réalisée n'est pas exhaustive mais qu'elle permet d'étudier l'expression d'une certaine partie des gènes d'*E. coli*.

Pour isoler les gènes dont la transcription est affectée par la présence de mercure, les 7500 clones de la banque ont été criblés puis repiqués sur un milieu LB additionné de X-Gal contenant des concentrations croissantes de HgCl_2 de 0 ppm, 1 ppm et 10 ppm. Après 48 h de croissance, la coloration bleue des clones a été comparée et un candidat potentiel, dont la coloration s'était intensifiée en fonction de la concentration de mercure ajouté, a été isolé. En effet, la variation de la coloration correspondait à une fusion dont l'expression est induite par le mercure. Les résultats présentés par la suite porteront sur ce clone que nous avons nommé HG7.

I.2. Caractérisation de la réponse du clone HG7 au mercure

La quantité de β -galactosidase produite par la souche HG7 en présence et absence de mercure est déterminée afin de caractériser sa réponse. Un test préliminaire est réalisé avec HG7 cultivé sur un milieu Luria Bertani gélosé. La figure 7a présente l'activité β -galactosidase de HG7 en fonction de la concentration de HgCl_2 .

En absence de mercure, l'expression basale de la fusion dans le génome de HG7, correspond à une activité β -galactosidase de l'ordre de 10 unités. Cette valeur n'augmente pas en réponse à 1 ppm de HgCl_2 . En revanche, elle est trois fois plus importante en présence de 10 ppm de HgCl_2 . Ces résultats indiquent que le clone HG7 possède une fusion au niveau d'un gène induit par le mercure.

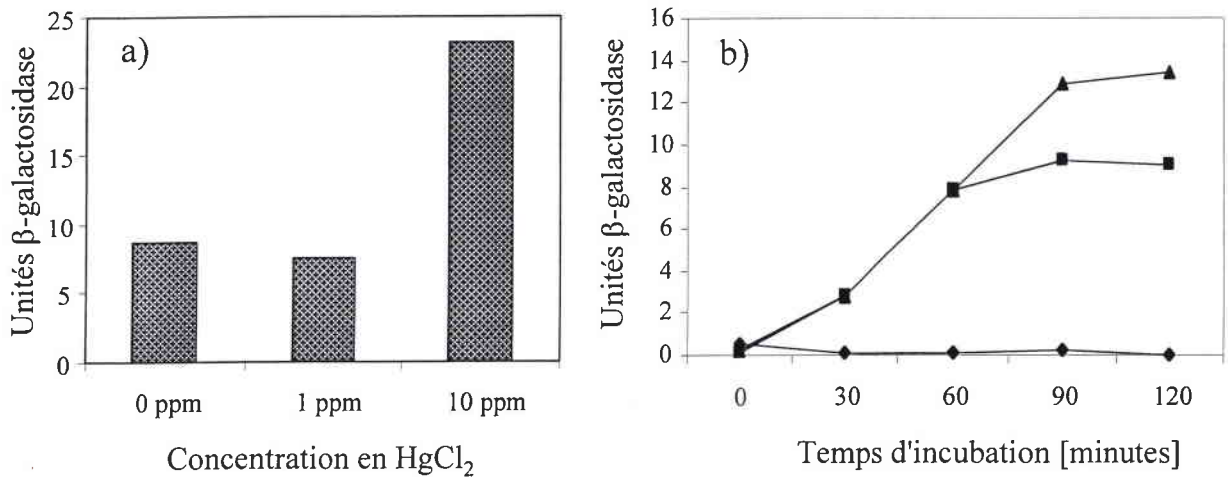


Figure 7 : Activité β-galactosidase de la souche HG7 en fonction de la concentration de HgCl₂.

a) Sur milieu LB solide : les cellules sont cultivées pendant 24 heures sur boîte de Pétri contenant du Luria Bertani Agar supplémenté avec les concentrations de HgCl₂ indiquées.

b) Cinétique en milieu LB liquide : Une culture en phase exponentielle de croissance a été incubée avec des concentrations ajoutées de HgCl₂ de 0 ppm (◆), 0,5 ppm (■) ou 1 ppm (▲).

Afin de confirmer ces résultats, des cinétiques de 2 heures en milieu LB liquide ont été réalisées en phase exponentielle de croissance (figure 7b). L'expression de base est inférieure à 1 unité de β-galactosidase et est stable au cours du temps. Lorsque les cellules sont exposées au Hg(II), l'expression de la fusion est induite après 30 minutes d'incubation. Plus précisément, l'activité β-galactosidase augmente de façon continue pendant 90 minutes pour atteindre des valeurs maximales de respectives de 9 unités et de 13 unités en réponse à 0,5 ppm et 1 ppm de HgCl₂.

Comparé avec le dosage sur milieu gélosé, la réponse des cellules au HgCl₂ est plus élevée en milieu liquide. En effet, pour une concentration de 1 ppm de Hg(II), la réponse est maximale en milieu liquide, tandis qu'elle correspond à l'expression de base sur milieu solide. D'autre part, une culture de HG7 en milieu liquide ne peut plus se développer à des concentrations de mercure de 10 ppm (résultats non-présentés).

Nous avons ainsi montré, grâce à la fusion génétique dans le clone HG7, qu'il existe un gène chromosomique chez *E. coli* dont la transcription est induite en présence de HgCl₂. La question qui se pose à ce point est la nature du gène ou du locus fusionné à *lacZ* dans ce clone HG7.

I.3. Analyse de la fusion *x::lacZ* dans *E. coli* HG7

L'objectif du travail décrit dans cette partie était d'identifier le gène dont l'expression est régulée par le mercure. Il s'agit donc de trouver l'endroit précis dans l'ADN génomique de HG7, où s'est inséré le phage Mud1*lac*. La stratégie suivante a été adoptée : Dans un premier temps, la région de la fusion a été cartographiée. Un fragment d'ADN comportant la fusion a ensuite été cloné dans le plasmide pBR322. Enfin, le site exact de l'insertion de phage Mud1*lac* a été identifié par séquençage.

I.3.1 Analyse par Southern Blot

A l'aide de la technique d'hybridation d'ADN, par Southern Blot (Southern, 1975), nous avons pu obtenir une carte de restriction de la région d'insertion du phage dans le génome de HG7, ce qui nous a indiqué les endonucléases à employer pour sous-cloner la fusion. Cette analyse a également permis de déterminer le nombre d'insertions de Mud1*lac*, afin de confirmer qu'une seule fusion de *lacZ* était responsable de l'activité β -galactosidase mesurée, et qu'il ne s'agissait pas d'un artéfact. Ainsi, l'ADN génomique de HG7 a été digéré par six endonucléases : *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I et *Sac*I. Contrairement à l'endonucléase *Sac*I, qui ne nous a pas permis de digérer l'ADN de HG7, les enzymes *Bam*HI, *Bg*III, *Eco*RI, *Hind*III et *Pst*I ont respectivement généré des profils de digestion avec des bandes de différentes tailles (figure 8a).

Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les fragments d'ADN ont été hybridés à une sonde d'ADN marquée à la digoxygénine complémentaire au gène *lacZ*. La sonde correspondait à un fragment de 2,6 kb obtenu par digestion du plasmide pXW1 par *Hind*III. Les fragments d'ADN de HG7 portant la fusion avec le gène rapporteur ont ensuite été visualisés (figure 8b). Pour chacun des 5 profils de digestion enzymatique obtenus, la sonde ne s'est hybridée qu'avec un seul fragment d'ADN. Ainsi, nous avons confirmé qu'une copie unique de Mud1*lac* s'est insérée dans le génome de HG7.

Ensuite, une carte de restriction, de la région génomique de HG7 où Mud1*lac* s'est fusionné, a été établie (figure 8c). Son analyse indique l'existence de sites de restriction de *Bam*HI et *Bg*III à une distance de 11 kb en amont de Mud1*lac*. Des sites *Pst*I et *Eco*RI sont respectivement présents à 6 kb et 3,5 kb en amont de Mud1*lac*. Enfin, Mud1*lac* contient deux

sites *Hind*III distants de 20,1 kb et encadrant l'opéron *lac*. Une bande de taille similaire est bien observée au niveau du profil de restriction par *Hind*III (figure 8b, piste 5).

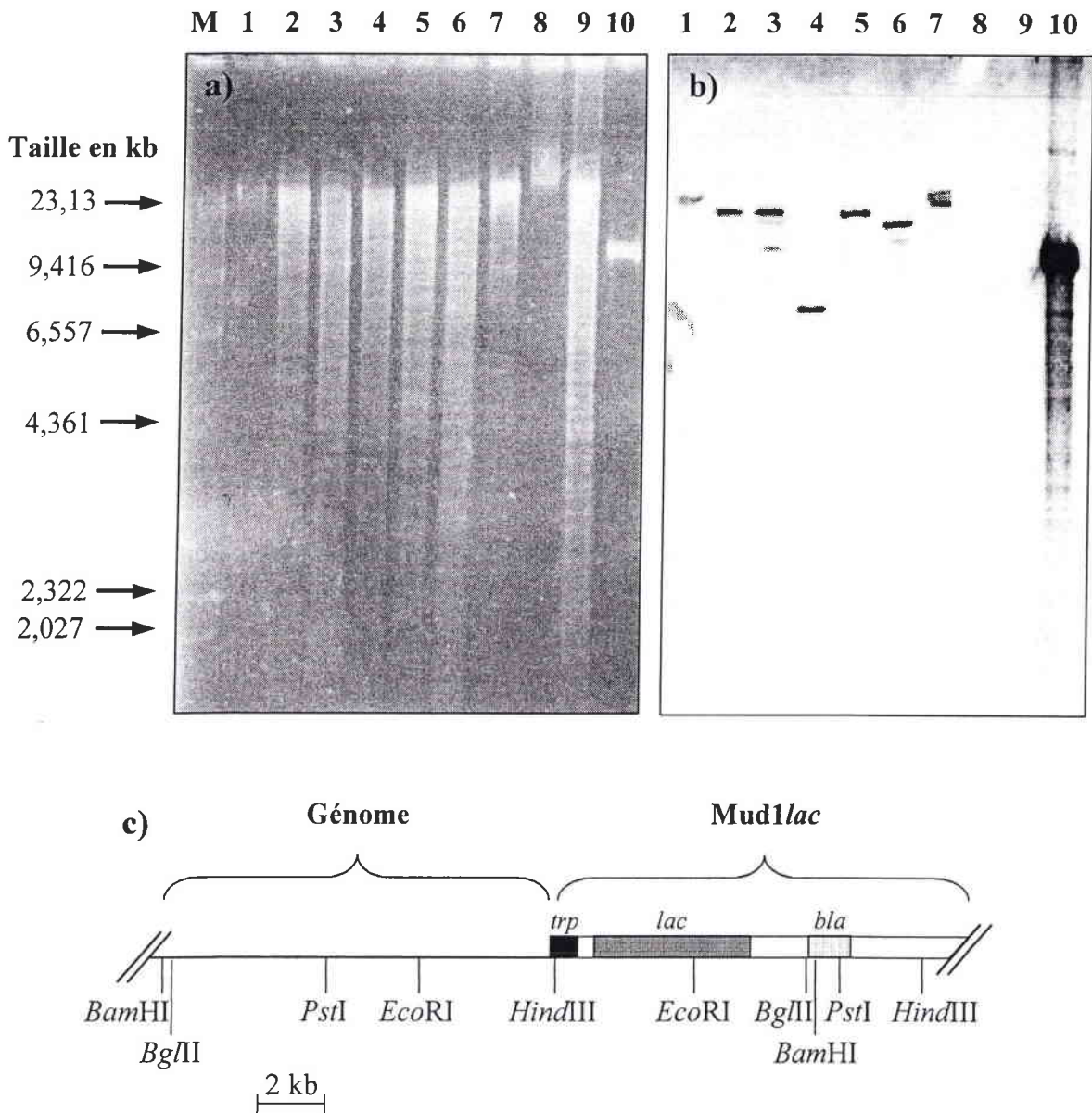


Figure 8 : Cartographie de la fusion de HG7 par hybridation.

a) Profils de digestion de l'ADN génomique de HG7

b) Résultats du Southern Blot réalisé sur l'ADN de HG7.

Un fragment de 2,6 kb du plasmide pXW1 contenant le gène *lacZ* marqué à la digoxigénine est utilisé comme sonde. L'ADN génomique de HG7 a été déposé non-digéré (1) et digéré par *Bam*HI (2), *Bgl*II (3), *Eco*RI (4), *Hind*III (5), *Pst*I (6) et *Sac*I (7). L'ADN de MC4100 (*lac*⁻) non-digéré (8) et digéré par *Eco*RI (9) et le plasmide pXW1 (10) (taille 10,7 kb) ont servi de témoin. Le marqueur de taille (M), le phage λ digéré avec *Hind*III, est présenté schématiquement à gauche de l'image.

c) Carte de restriction de la fusion dans HG7 déduite des résultats du Southern Blot.

Cette carte de restriction nous a donné des informations pour la suite de l'analyse, qui consistait à sous-cloner la fusion dans un vecteur plasmidique. Les fragments générés par digestion avec *Bgl*III ou *Bam*HI sont de taille importante (environ 20 kb), ce qui rendait leur clonage à priori difficile. Cependant, ces fragments comprennent une grande partie de l'ADN génomique et le gène *lacZ* sur *Mud1lac*, qui est nécessaire pour le criblage des clones recombinants par coloration sur X-Gal par la suite. Le fragment généré par *Eco*RI est plus petit, mais il ne contient qu'une partie de *lacZ*, ce dernier est donc non-fonctionnel pour le criblage des transformants. Enfin, le fragment *Pst*I est également de grande taille (17 kb) et il intègre le gène de résistance à l'ampicilline de *Mud1lac*. Pour des raisons de faisabilité, nous avons choisi de cloner le fragment *Bgl*III pour sous-cloner la fusion dans le vecteur pBR322.

I.3.2. Clonage de la fusion du génome de HG7

Cette étape du travail (figure 9) a consisté à isoler la fusion du génome de HG7 par digestion par *Bgl*III et d'insérer les fragments dans le plasmide pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977). Ce fragment *Bgl*III de 20 kb porte une partie du génome de HG7 et le gène rapporteur *lacZ* du phage *Mud1lac*. Le plasmide pBR322 comporte des gènes qui confèrent la résistance à deux antibiotiques, l'ampicilline (*bla*) et la tétracycline (*tet*), ainsi qu'un site de restriction *Bam*HI unique dans lequel les fragments *Bgl*III issus de la digestion du génome de HG7 ont été intégrés. Comme ce site *Bam*HI est contenu dans le locus *tet*, la résistance à la tétracycline est perdue lors d'une insertion d'ADN dans ce site. Ainsi, lors du clonage, le mélange de ligation a été utilisé pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli* DH10B (*lac*⁻) et la sélection des transformants portant le plasmide recombinant recherché se fera sur milieu contenant de l'ampicilline et du X-Gal pour distinguer les plasmides portant le gène *lacZ* provenant de *Mud1lac*. Ainsi, nous avons pu isoler six colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline et de couleur bleue. Ces clones sont également sensibles à la tétracycline.

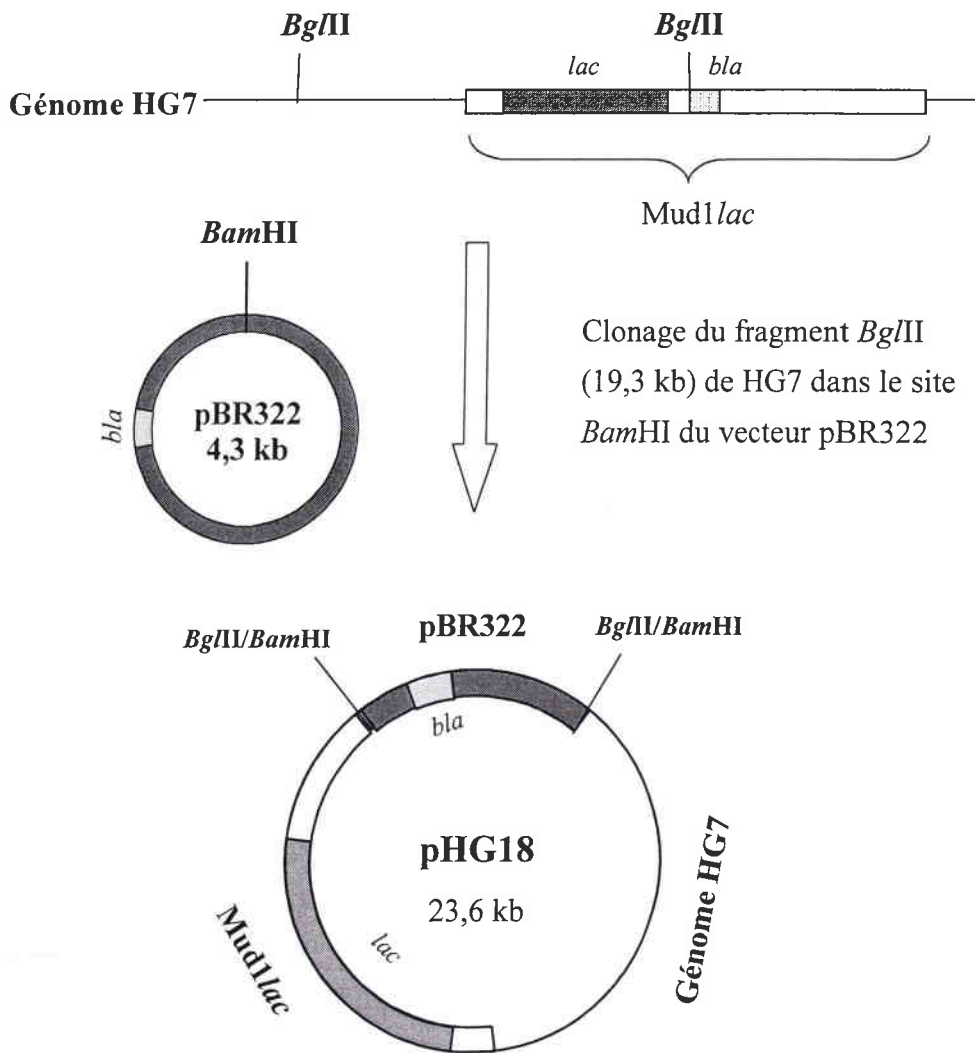


Figure 9 : Procédé schématique de l'isolement du fragment d'ADN contenant la fusion dans HG7.

Le fragment *Bgl*III est cloné dans le vecteur pBR322/*Bam*HI.

Une analyse par restriction des plasmides extraits de ces 6 transformants a révélé que quatre d'entre eux étaient identiques et que leur profil correspondait bien aux informations données par le Southern Blot. Ce plasmide, nommé pHG18, a été analysé par digestion par les endonucléases *Eco*RI, de *Hind*III et de *Pst*I (Figure 10a).

A l'aide des sites de restriction connus sur pBR322 et *Mud1lac*, nous avons pu déterminer le sens d'insertion du fragment *Bgl*III dans le vecteur et établir une carte de restriction (Figure 10b). La taille de pHG18 s'élève à 23,6 kb dont la partie du génome dans laquelle se trouve le gène recherché fait 10,8 kb. Cette partie génomique contient un site *Eco*RI, deux sites *Hind*III et trois sites *Pst*I. Cependant, la précision de ces sites ne nous a pas

permis une comparaison avec la carte de restriction du génome d'*E. coli* dans la banque de données.

Ainsi, nous avons pu isoler le locus de la fusion présente dans HG7 sur le plasmide pHG18. L'analyse par restriction est bien compatible avec les données précédemment obtenues par Southern Blot. L'étape finale de l'analyse de la fusion a consisté à séquencer la partie génomique présente sur le plasmide pHG18.

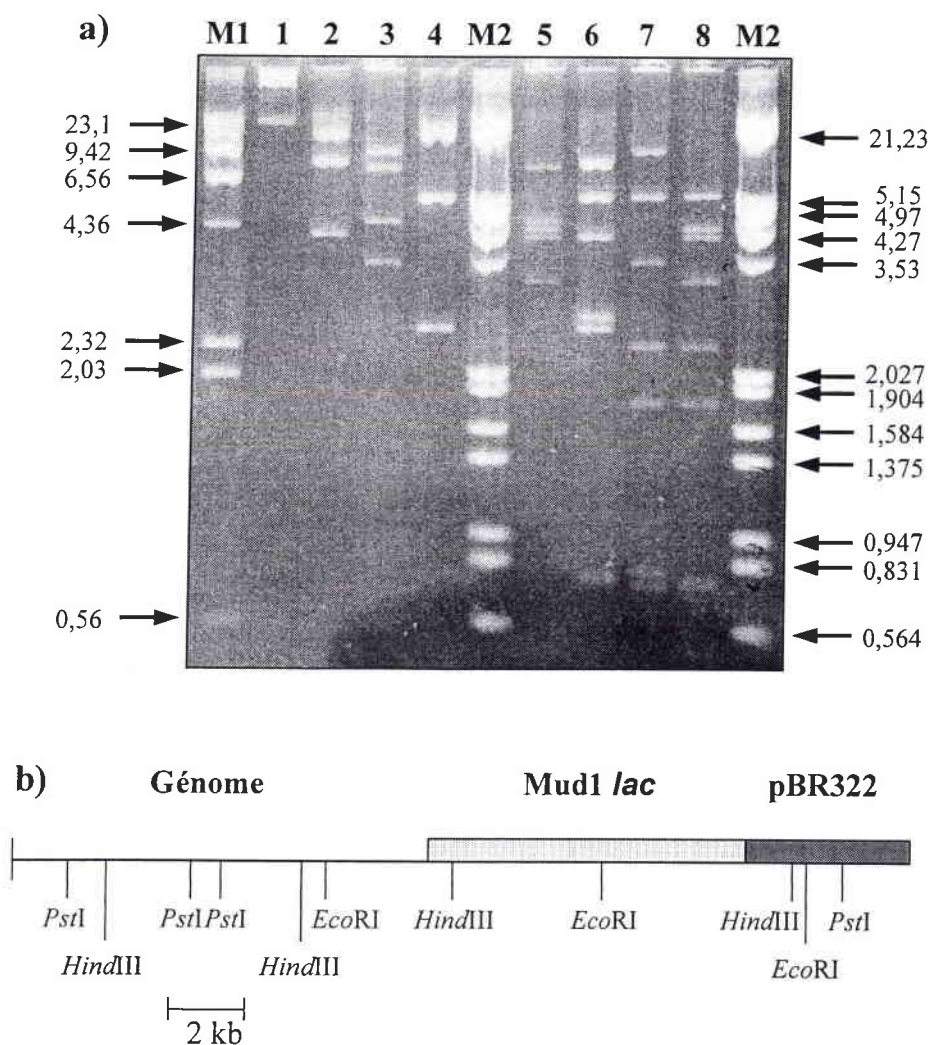


Figure 10 : Carte de restriction de pHG18

a) Analyse de la digestion du plasmide pHG18 par électrophorèse sur gel d'agarose. Le plasmide est non-digéré (1), digéré avec *EcoRI* (2), *HindIII* (3), *PstI* (4), *EcoRI* + *HindIII* (5), *EcoRI* + *PstI* (6), *HindIII* + *PstI* (7), *EcoRI* + *HindIII* + *PstI* (8). Les marqueurs sont le phage λ /*HindIII* (M1) et λ /*PstI* (M2).

b) Carte de restriction du plasmide pHG18 déduite des résultats présentés en figure 10a.

I.3.3. Analyse de la séquence de pHG18

Afin d'identifier le gène fusionné à *Mud1lac*, nous avons séquencé partiellement le fragment *Bgl*III du plasmide pHG18 qui porte la partie génomique de la souche HG7. Comme indiqué dans la figure 11, ce fragment est compris entre le vecteur pBR322 et la partie de *Mud1lac* à laquel le fragment est fusionné. Pour le séquençage, les amorces 1357, 1358 et *Trp1* ont été utilisées ; elles ont été positionnées et orientées comme indiqué en figure 11.

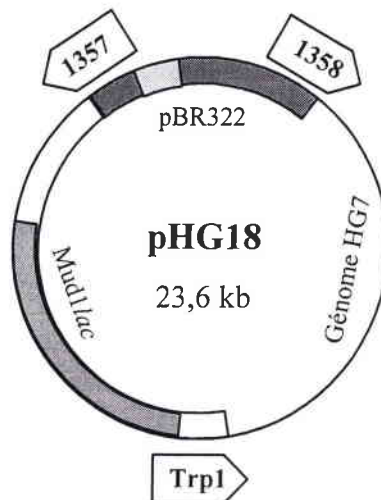


Figure 11 : Représentation schématique de la position et la direction des amorces utilisées pour le séquençage de pHG18.

La séquence qui nous intéresse le plus est celle obtenue à partir de l'amorce *Trp1* qui s'hybride à l'extrémité du phage *Mud1lac* et permet donc de déterminer de façon précise le site d'intégration. Les séquences à partir des amorces 1357 et 1358 servent de confirmation sur la construction pHG18. En effet, 1357 et 1358 s'hybrident aux parties de pBR322 de part et d'autre du site *Bam*HI, et ils permettent ainsi de déterminer les séquences des deux extrémités du fragment *Bgl*III de pHG18.

Les séquences d'ADN obtenues à l'aide de ces trois amorces ont été comparées à l'aide du programme de comparaison de séquences BLASTN (Altschul *et al.*, 1990), à celles disponibles dans les banques de données (GenBank).

La séquence obtenue à partir de *Trp1* (35 nucléotides) a présenté une identité de 98% avec *yhhO* ou *o732* du génome d'*E. coli* (Sofia *et al.*, 1994), une phase ouverte de lecture qui

a été récemment publiée comme correspondant à un gène nommé *zntA*, impliqué dans la résistance à différents métaux lourds (Beard *et al.*, 1997). Le phage Mud1*lac* est inséré à 37 pb en aval de ce cadre de lecture ouvert (ORF) de *zntA*. La séquence détaillée avec le site d'insertion du phage Mud1*lac* est présentée ci-dessous :

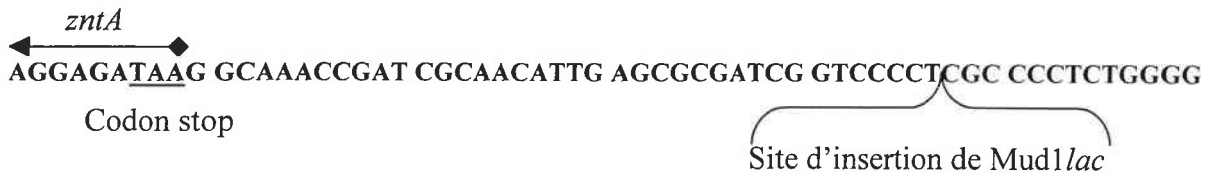


Figure 12 : Séquence d'ADN du site d'insertion de Mud1*lac*.

La séquence issue de l'oligonucléotide 1358 est située à 10,636 kb en amont du site d'insertion de Mud1*lac* sur le génome et confirme ainsi l'insertion de Mud1*lac* dans cette région précise. Le séquençage avec l'amorce 1357 révélait qu'il s'agit bien d'une séquence du phage Mud1*lac*.

I.4. Caractérisation de *zntA*

Le gène *zntA* se trouve entre 75,5 min et 76,2 min sur le génome d'*Escherichia coli*. Ce gène code une protéine membranaire de 732 acides aminés appartenant à la famille des ATPases de type P (Beard *et al.*, 1997). Leur fonction consiste à transporter activement des cations à travers des membranes biologiques. ZntA (pour Zinc Tolérance ou Transport) est impliquée en particulier dans la translocation vers l'extérieur de la cellule de certains métaux lourds, tels que le zinc, le cadmium et le plomb. Ainsi, cette protéine confère à *E. coli* une résistance accrue à certains métaux lourds toxiques et est impliquée dans l'homéostasie du zinc (Beard *et al.*, 1997 ; Sharma *et al.*, 2000).

Les résultats présentés ci-dessus montrent donc que l'expression de *zntA* est régulée par la présence de Hg(II). Dans la suite de ce travail, nous avons voulu étudier le rôle de *zntA* dans la résistance aux métaux lourds et étudier la régulation de son expression en présence d'autres ions métalliques.

I.4.1. Expression de *zntA* en présence de métaux lourds

Au moment où nous avons effectué ces expériences, seuls le Cd(II), le Pb(II) et le Zn(II) étaient connus comme substrats de ZntA (Rensing *et al.*, 1997 et 1998). A l'aide de la fusion *zntA::lacZ* présente dans la souche HG7, nous avons étudié la spécificité d'induction du gène *zntA* par des métaux lourds.

Dans un premier temps, des mesures de l'activité β -galactosidase de la souche HG7 ont été effectuées en milieu LB et en présence de composés inorganiques de mercure (Hg(I) et Hg(II)) et des composés organométalliques tels que le chlorure d'éthylmercure et l'acétate de phénylmercure. Durant les 2 h d'incubation et aux concentrations choisies, aucune induction significative de l'activité β -galactosidase n'a été mesurée pour les organomercures, tandis que les formes ioniques de mercure induisaient l'expression de la fusion (figure 13a).

Une série de métaux lourds autres que le mercure a également été testée sur le clone HG7. Trois des 8 métaux testés, le cadmium, le plomb et le zinc, induisaient l'expression de la fusion. En revanche, en présence des cations de Ni(II), de Co(II), de Cu(II), de Sn(II) et de l'oxyanion CrO_4^{2-} pour les concentrations utilisées, l'activité β -galactosidase de HG7 ne dépassaient pas l'activité de base (figure 13b). Notons que des précipités visibles se sont formés dans le milieu réactionnel en présence de Ni(II), de Co(II) et de Cu(II) pour des concentrations supérieures de 5 ppm susceptibles de perturber les mesures spectrophotométriques. Ainsi, nous ne pouvons pas tester la réponse de HG7 aux plus fortes concentrations en métaux lourds.

Dans ces conditions de test et après 2 heures d'incubation, HgCl_2 et $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ induisent respectivement des activités β -galactosidase de 14 unités et 13 unités. En revanche, PhHgOAc et EtHgCl induisent entre 2 et 4 unités de β -galactosidase. Enfin, le cadmium, le plomb et le zinc induisent respectivement des activités β -galactosidase de 10 unités, 7 unités et 4 unités. Ainsi, les composés inorganiques de mercure sont les inducteurs les plus forts, les autres métaux induisent l'expression de la fusion *zntA::lacZ* plus faiblement et à des concentrations plus élevées comprises entre 5 ppm et 10 ppm.

Ces résultats démontrent que les cations de mercure, de cadmium, de plomb et de zinc sont des inducteurs de la fusion génétique *zntA::lacZ* présente dans le clone HG7, et que l'induction est concentration-dépendante.

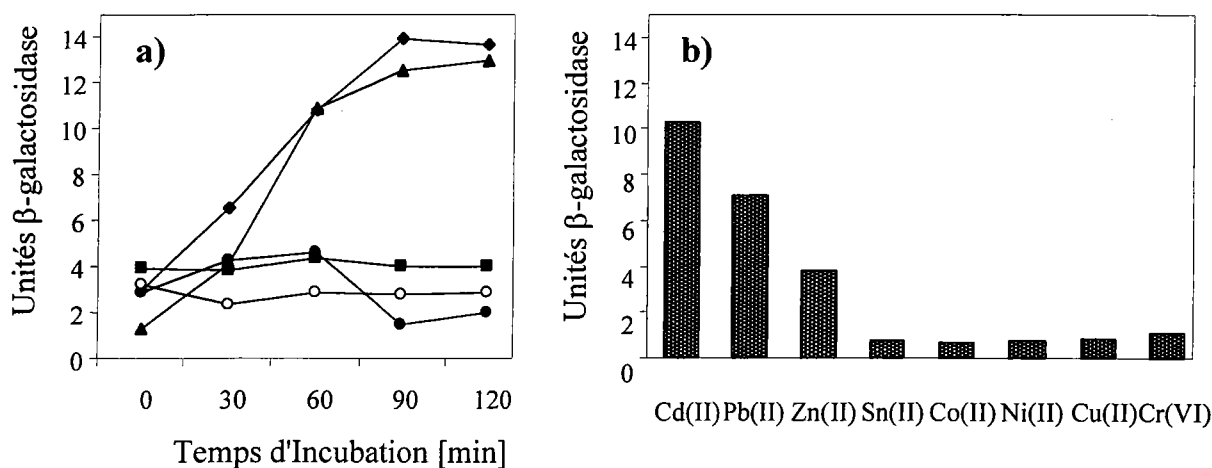


Figure 13 : Activité β-galactosidase du clone HG7 en présence de métaux lourds.

a) Cinétique en absence (○) et en présence de 1 ppm de HgCl₂ (◆), de 1 ppm de Hg₂(NO₃)₂ (▲), de 0,5 ppm de PhHgOAc (■) et de 0,5 ppm de EtHgCl (●).

b) Activité β-galactosidase de HG7 après 2 h d'incubation en présence de CdCl₂ (5 ppm), de Pb(NO₃)₂ (5 ppm), de ZnSO₄ (10 ppm), de SnCl₂ (5 ppm), de CoCl₂ (5 ppm), de NiCl₂ (5 ppm), de CuCl₂ (5 ppm) et de K₂CrO₄ (1 ppm). L'activité de base est de 0,73 unités.

I.4.2. Influence de *zntA* sur la résistance aux métaux lourds

Comme nous l'avons déjà exposé, la fonction connue de la protéine ZntA est d'augmenter la résistance de la bactérie aux métaux lourds en les expulsant hors de la cellule. Il était donc intéressant de connaître l'impact de *zntA* sur la survie d'*E. coli* en présence de fortes concentrations des métaux qui induisent la transcription du gène, car ce sont à priori ces métaux qui sont détoxiqués par ZntA.

Nous avons donc étudié l'influence de *zntA* sur la résistance aux ions de Cd(II), Hg(II), Pb(II) et Zn(II). Pour effectuer ces tests, il nous fallait disposer d'une souche mutante pour le gène *zntA*. Or, nous avons montré précédemment que dans la souche HG7, le phage Mud1lac était intégré dans une région transcrite de *zntA*, mais en aval de l'ORF, ce qui supposait que la protéine ZntA était fonctionnelle dans cette souche. Nous nous sommes donc procuré les souches *E. coli* SJB123 et SJB124 et le plasmide pSJB07 de Robert Poole (Université de Sheffield, Beard *et al.*, 1997). SJB123 et SJB124 sont des dérivés de la souche *E. coli* MG1655. SJB123 porte une mutation dans le gène *zntA* (*zntA*⁻), et SJB124 est *zntA*⁺. Nous avons également réalisé un essai de complémentation de *zntA* à l'aide du plasmide pSJB07. En effet, ce plasmide porte un fragment d'ADN contenant un fragment *Hind*III-*Hind*III chromosomique de 7,7 kb avec le gène *zntA* entier cloné dans le vecteur pACYC177 (Chang

et Cohen, 1978). Un deuxième essai de complémentation a été effectué à l'aide du plasmide pHG18. En effet, ce plasmide porte le gène *zntA* fusionné avec *Mud1lac* à 37 pb en aval de l'ORF.

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices des 4 souches en présence de HgCl_2 , de CdCl_2 , de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de ZnSO_4 dans un milieu minimum (GIGM). Les résultats dans le tableau 10 indiquent que la souche SJB123 (*zntA*⁻) présente une grande sensibilité au Cd, Pb et Zn, tandis que SJB124 est 10 fois plus résistante au cadmium et au zinc, et 20 fois plus résistante au plomb. En présence de mercure, les bactéries sont généralement très sensibles avec une CMI comprise entre 0,6 μM et 0,8 μM . La différence de sensibilité vis-à-vis du mercure entre les souches *zntA*⁻ et *zntA*⁺ est infime et probablement non-significative.

	CMI en μM :			
	Cd	Hg	Pb	Zn
SJB123	3	0,6	4	3
SJB124	20	0,8	70	30
SJB123/pSJB07	20	0,8	80	30
SJB123/pHG18	2	0,6	3	3

Tableau 10 : Influence de *zntA* sur la résistance d'*E. coli* à la présence de HgCl_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et ZnSO_4 .

Les concentrations minimales inhibitrices sont déterminées dans du milieu GIGM.

La souche SJB123/pSJB07 présente les mêmes caractéristiques de résistance aux métaux lourds que SJB124, confirmant les résultats de Beard *et al.* (1997). En revanche, pHG18 ne complémente pas la mutation *zntA*⁻.

I.4.3. Induction de *zntA* sur le plasmide pHG18

Les informations obtenues dans les études précédentes indiquent que la fusion chromosomique *zntA::lacZ* était induite par des composés inorganiques de cadmium, plomb et zinc. Afin d'étudier l'expression de cette fusion placée sur un plasmide multicopie, nous avons suivi l'évolution de l'activité β -galactosidase d'*E. coli* DH10B/pHG18 au cours du temps en présence et absence de HgCl_2 . Les résultats sont présentés en figure 14.

Par rapport aux mesures effectuées avec la fusion chromosomique dans HG7, le niveau d'induction est nettement plus élevé. L'activité basale en absence de mercure est de l'ordre de 15 unités, et elle légèrement plus élevée à 0,1 ppm. En présence de 0,5 ppm et 1 ppm de Hg(II), l'activité augmente continuellement tout au long de la mesure pour atteindre 250 unités après 150 minutes. A une concentration de 3 ppm, l'expression de la fusion est moins importante qu'en réponse à 1 ppm. Ce dernier résultat indique qu'à 3 ppm, la toxicité de mercure est trop importante et perturbe la physiologie de la cellule.

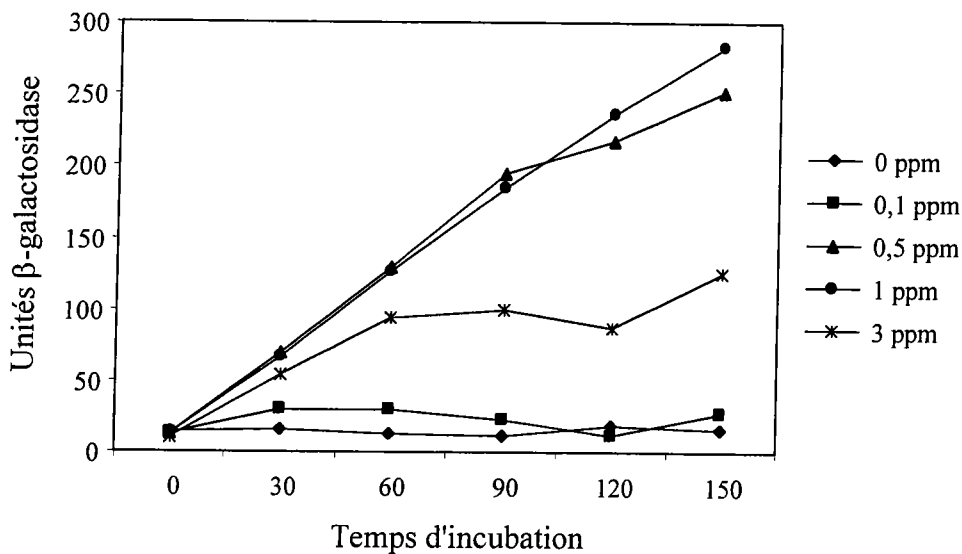


Figure 14 : Evolution de l'activité β -galactosidase d'*E. coli* DH10B/pHG18 en fonction du temps.

Une culture dans un milieu LB à une densité optique de $A_{600}=0,12$ a été incubée avec différentes concentrations de $HgCl_2$ et l'activité β -galactosidase a été dosée toutes les 30 minutes. La densité optique des cultures après 2,5 heures s'élève à $A_{600}=0,92$ (0 ppm), 0,88 (0,1 ppm), 0,76 (0,5 ppm), 0,69 (1 ppm) et 0,29 (3 ppm).

Globalement, il apparaît donc que le profil d'induction de la fusion *zntA::lacZ* plasmidique par Hg(II) est similaire à celui de la fusion chromosomique (figure 7b), avec toutefois un niveau basal d'expression plus élevé.

I.5. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons employé avec succès la technique de la fusion transcriptionnelle pour rechercher chez *E. coli* des réponses génétiquement programmées à un stress chimique tel que la présence de HgCl₂. A l'issue de ce criblage, nous avons isolé un clone, nommé HG7, portant une fusion génétique avec le gène rapporteur *lacZ* dont l'expression est modifiée par la présence de HgCl₂.

Le clone HG7 a été isolé et sa fusion génétique a été clonée dans un vecteur pBR322 afin de pouvoir séquencer le gène qui est responsable de la réponse au mercure. L'analyse par séquençage a révélé qu'il s'agit du gène *zntA* qui est induit par la présence du mercure. Le phage Mud1*lac*, s'était inséré précisément à 37 pb en aval de la phase ouverte de lecture de *zntA* dans le génome d'*E. coli*.

Nous avons montré que la fusion *zntA::lacZ* qui a été identifiée chez la souche HG7 était inductible par la présence des composés inorganiques de cadmium, de mercure, de plomb et de zinc. Le gène *zntA* représente donc une réponse génétiquement programmée à la présence de métaux lourds. En effet, *zntA* code pour une ATPase de type P impliquée dans la résistance d'*E. coli* aux métaux lourds par un transport actif (Beard *et al.*, 1997).

Rensing *et al.* (1997 ; 1998) ont démontré par utilisation de vésicules membranaires inversées que ZntA exporte des cations de Zn(II), de Cd(II) et de Pb(II). Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que le rôle physiologique de *zntA* de détoxiquer les métaux non-essentiels tels que le cadmium et le plomb et d'augmenter ainsi la résistance vis-à-vis de ces métaux. La protéine *zntA* joue donc un rôle important dans l'homéostasie du zinc qui est un élément trace essentiel. Pour d'autres métaux, dont le mercure, aucune activité de translocation n'a pu être mise en évidence (Rensing *et al.*, 1997). Par ailleurs, Sharma *et al.* (2000) ont observé que ZntA présente une activité d'hydrolyse de l'ATP qui est stimulée par la présence de Cd, de Pb et de Zn et surtout de Hg. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le site de fixation des métaux lourds en région amino-terminale de la protéine ZntA est capable de lier le mercure, tandis que le canal de transport ne montre pas d'affinité pour ce métal.

Nous avons confirmé la fonction de *zntA* par mesure de la concentration minimale inhibitrice. Ainsi, un mutant de *zntA* (SJB123) a présenté une sensibilité accrue à la présence de cadmium, de plomb et de zinc, tandis que la résistance au mercure n'est pas affectée par

zntA. Le gène *zntA* d'*E. coli* ne constitue donc pas un système qui confère la résistance au mercure. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Beard *et al.*, 1997 ; Rensing *et al.*, 1998).

Nous avons pu montrer une restauration de la résistance aux métaux lourds lorsque *zntA* est exprimé sur un plasmide (pSJB07). Par un essai de complémentation avec la fusion placée sur le plasmide pHG18, nous avons constaté que l'insertion de *Mud1lac* empêche une expression fonctionnelle de *zntA* dans HG7. Cette fusion qui s'était établie en aval de l'ORF de *zntA* affecte probablement la transcription ou la traduction du gène. Nous n'avons pas approfondi nos recherches pour comprendre ce phénomène, car cela ne faisait pas partie des objectifs de cette étude.

Même si *zntA* ne confère aucune résistance au mercure, l'expression de la fusion *zntA::lacZ* dans HG7 telle que nous l'avons mesurée est considérablement activée en présence de composés inorganiques de mercure, même si le mercure n'est pas transporté. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par Babai et Ron (1998) qui ont également mesuré une augmentation de l'expression de *zntA* en présence de HgCl_2 , sans qu'il y ait une meilleure résistance envers ce composé.

Nos résultats comme ceux de Babai et Ron (1998) peuvent être expliqués par les mécanismes de régulation transcriptionnelle de *zntA*. En effet, l'expression de *zntA* est régulée par ZntR, une protéine qui fait partie de la famille de trans-activateurs de transcription procaryote comme MerR (Brocklehurst *et al.*, 1999). Cette protéine, qui est fixée sur le promoteur de *zntA*, active la transcription du gène lorsqu'elle est exposée aux métaux lourds. Le mécanisme d'activation transcriptionnelle a été élucidé pour la présence de Zn(II), mais on suppose que Cd(II) ou Pb(II) fonctionnent de la même manière pour activer la transcription de *zntA* (Outten *et al.*, 1999). Le mercure, ne faisant pas partie des substrats de ZntA, peut donc être considéré comme inducteur gratuit de l'expression de *zntA*, probablement via une réactivité croisée avec le régulateur ZntR (Brocklehurst *et al.*, 1999).

En présence d'autres métaux lourds, tels que le Cr(VI), le Co(II), le Cu(II), le Ni(II) ou le Sn(II), nous n'avons mesuré aucune induction significative dans nos conditions d'essai et les concentrations métalliques choisies. En effet, à des concentrations supérieures à 5 ppm (76-85 μM) le cobalt, le nickel et le cuivre ont formé des précipités avec le phosphate inorganique dans le mélange réactionnel faussant ainsi les mesures spectrophotométriques. Pourtant, Binet et Poole (2000) ont mesuré une activation transcriptionnelle de *zntA* en

présence de concentrations supérieures à 0,5 mM de Co(II), de Ni(II) et de Cu(II) à l'aide d'une fusion *zntA::lacZ*. Nous n'avons donc pas pu confirmer ces données. Ces métaux sont probablement des inducteurs présentant une faible affinité pour ZntR. En général, selon la littérature, les activateurs transcriptionnels de la famille de MerR, dont fait partie ZntR, sont comparables au niveau du mécanisme de fonctionnement ; la structure de ces protéines permet une fixation très spécifique pour les substrats activateurs (Outten *et al.*, 1999). Par exemple le site de fixation de métaux chez MerR a une affinité apparente pour le mercure qui est 100 fois plus élevée par rapport aux autres métaux du groupe 12, le cadmium et le zinc (Zeng *et al.*, 1998), mais cela n'exclut pas des inductions en présence d'une grande concentration de substrats même si l'affinité est faible.

Les résultats obtenus avec la fusion *zntA::lacZ* montrent que l'expression de *zntA* telle qu'elle est présente dans le chromosome de HG7 est très faible. L'activité β -galactosidase ne dépasse pas 15 unités même lors de l'induction par les ions de Cd, Hg, Pb et Zn. En revanche, lorsqu'elle est présente sur un plasmide chez DH10B/pHG18, la fusion exprime une activité β -galactosidase qui est 20 fois plus élevée en présence de mercure par rapport à la fusion chromosomique sur HG7 et cette réponse est toujours dose-dépendante. Ceci indique que la fusion *zntA::lacZ* est inductible sur plusieurs copies de plasmides, ce qui amplifie l'expression. Pourtant, il est difficile d'évaluer la proportion de *zntA* sur plasmide inductible, car on ne dispose pas d'informations précises d'une part sur le nombre de copies du plasmide présent dans la cellule et d'autre part sur la quantité de protéines régulateurs ZntR disponible. En effet, Outten *et al.* (1999) ont observé que ZntR forme un complexe avec la séquence promotrice de *zntA* pour faciliter la transcription, mais actuellement on ne dispose pas d'informations précises sur la régulation de l'expression de *zntR* (Brocklehurst *et al.*, 1999 ; Outten *et al.*, 1999). Ainsi, sachant que la fusion est localisée sur un plasmide dont le nombre de copies est variable, on ne peut pas savoir si la quantité de protéines ZntR présente dans le cytosol de la bactérie rapporteur est suffisante pour occuper tous les sites P_{zntA} .

Nous avons donc rassemblé les données nécessaires au développement d'un bioessai pour la détection de métaux lourds : sur la base de fusions génétiques de *lacZ* avec le gène *zntA*, nous sommes capables, par mesure de l'activité β -galactosidase de la bactérie qui porte cette fusion, de détecter des formes inorganiques des métaux lourds mercure, cadmium, plomb et zinc dans un échantillon. Cependant, la fusion avec le gène rapporteur *lacZ* ne

présente pas une méthode de test simple : elle exige le prélèvement d'un échantillon de culture afin de doser la β -galactosidase exprimée dans les bactéries. Au contraire, dans un biocapteur bactérien maniable, la bactérie rapporteur est directement couplée à un système de détection non destructif, de façon à ce qu'on puisse mesurer l'expression génétique en ligne. Pour obtenir ce type de capteur, nous avons remplacé, dans la suite de cette étude, le gène rapporteur *lacZ* par les gènes de bioluminescence *lux*.

II. Développement d'une souche rapporteur luminescente et mise en œuvre d'un test pour la détection de métaux lourds

Dans le chapitre précédent, nous avons recueilli les informations nécessaires sur la réponse de *zntA* pour l'utiliser comme détecteur des métaux lourds tels que le cadmium, le mercure, le plomb et le zinc : à partir de la fusion *zntA::lacZ*, il a été possible de mesurer l'induction de *zntA* en cas d'exposition de la souche rapporteur à ces métaux.

L'objectif que nous nous sommes fixé par la suite était de construire une souche rapporteur, basée sur une fusion *zntA::lux*, qui pourrait servir d'outil d'analyse de ces métaux. En effet, cette fusion présente sur un plasmide, devrait provoquer une émission de lumière quand la cellule est exposée aux ions des métaux lourds cadmium, mercure, plomb et zinc, et de façon dose-dépendante. Ce signal peut être détecté et quantifié à l'aide d'un luminomètre.

Dans ce chapitre seront donc présentés les travaux concernant la construction d'une souche d'*E. coli* portant une fusion plasmidique *zntA::lux* et l'étude de la réponse de cette souche rapporteur à la présence de métaux par luminométrie dans différentes conditions de mesure.

II.1. Construction de la fusion *zntA::lux*

Chez *Escherichia coli*, l'expression du gène *zntA* est induite en présence d'ions bivalents de cadmium, plomb et zinc, ainsi que par le mercure (Binet et Poole, 2000). La région promotrice du gène *zntA* (*PzntA*) a été étudiée en détail et le site de fixation du facteur de transcription ZntR est connu (Outten *et al.*, 1999). L'approche utilisée pour réaliser une fusion *zntA::lux* a consisté à amplifier cette région régulatrice par PCR, puis à la cloner en amont de l'opéron *luxCDABE* sur un plasmide.

II.1.1. Clonage du promoteur *PzntA*

Pour cloner la région promotrice de *zntA* située en amont du gène, un fragment d'ADN compris entre -95 et +34 par rapport au codon initiateur a été amplifié par PCR. Dans ce fragment se trouve le promoteur de *zntA* et donc le site pour la liaison avec ZntR. Les amorces

utilisées, nommées ZNT1 et ZNT2, ont été choisies pour s'hybrider à l'ADN comme indiqué dans la figure 15. Pour permettre le clonage ultérieur, des sites de restriction *Bam*HI en amont du promoteur de *zntA*, et *Eco*RI en aval du promoteur ont été introduits dans les amorces. Comme la séquence à amplifier est présente sur le plasmide pHG18, nous avons utilisé ce plasmide comme matrice d'amplification.

Le fragment obtenu par PCR a été ensuite cloné dans le vecteur pUCD615 que nous avons obtenu de C. Kado, Université de Californie (Rogowsky *et al.*, 1987). Ce plasmide comporte, en plus de gènes de résistance à l'ampicilline et la kanamycine, une cassette de l'opéron *lux* de *Vibrio fischeri* dépourvue de ses propres séquences régulatrices. En amont se trouve un site de clonage multiple, ce qui permet l'insertion des fragments d'ADN et la création de fusions transcriptionnelles avec les gènes *luxCDABE*.

Le plasmide pUCD615 a été linéarisé par double digestion avec *Bam*HI et *Eco*RI, deux sites de restriction situés au niveau du site de clonage multiple, afin d'y insérer le fragment de 130 pb obtenu par PCR préalablement hydrolysé par *Bam*HI et *Eco*RI. Après religation, nous avons obtenu une collection de plasmides, dont celui que nous recherchons et qui doit conférer, en plus de la résistance aux antibiotiques ampicilline et kanamycine, la production de lumière en présence de Cd(II), Hg(II), Pb(II) et Zn(II). Le mélange de ligation a été directement utilisé pour transformer la souche *E. coli* DH10B.

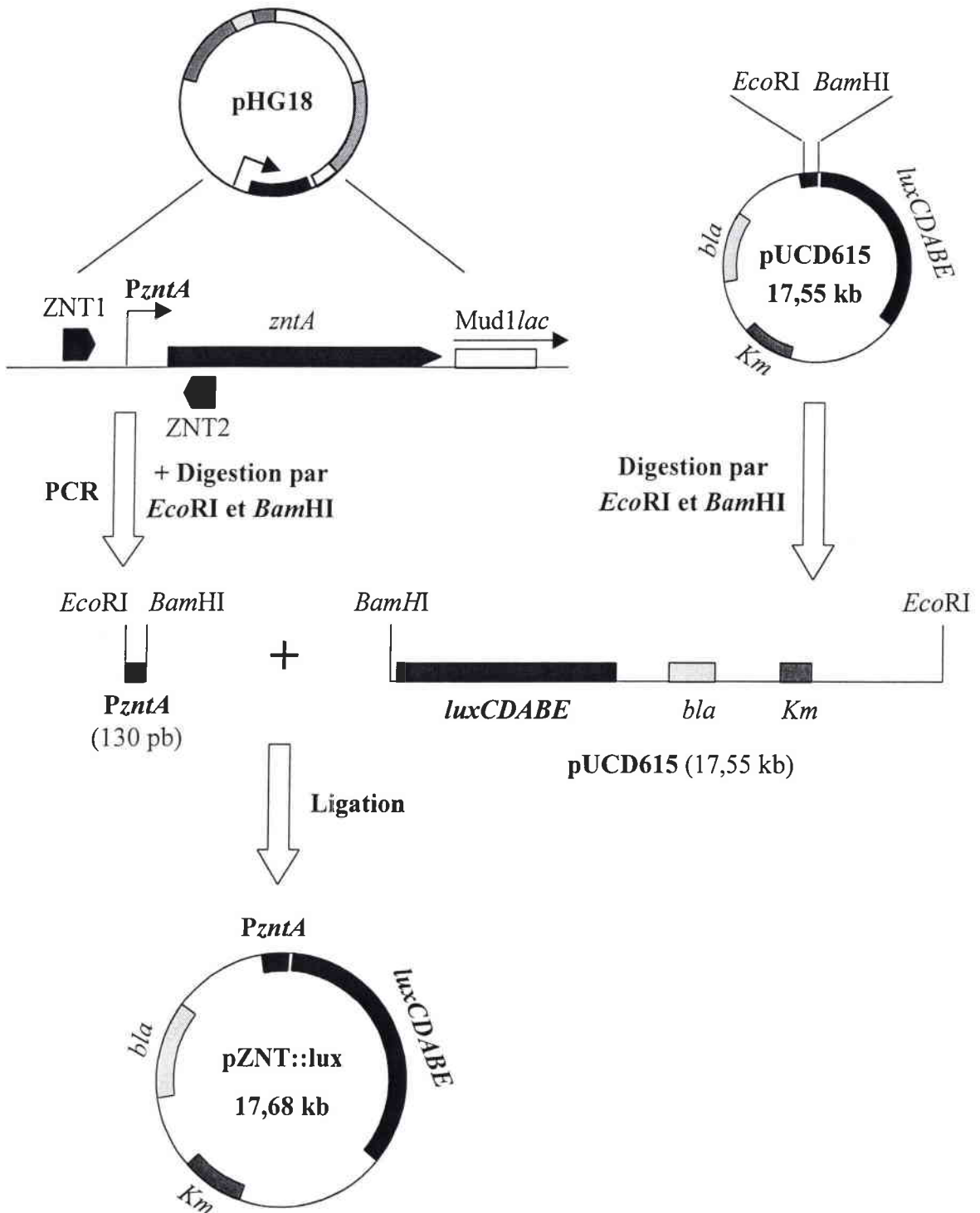


Figure 15 : Schéma de la construction plasmidique d'une fusion *zntA::luxCDABE*.

II.1.2. Isolement du plasmide rapporteur pZNT::lux

Les transformants obtenus en II.1.1 ont été sélectionnés sur leur résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Ensuite, ils ont été transférés sur des boîtes de Pétri contenant un milieu LB additionné par des concentrations croissantes de 0 μM , 4 μM et 40 μM en HgCl_2 . Après incubation des colonies à 30°C pendant une nuit, les boîtes de Pétri ont été couvertes d'un film rayon X, puis placées à l'obscurité pendant 30 minutes.

La plaque photographique a ensuite été développée avec un kit de développement KODAK selon les instructions du fournisseur. Les colonies portant le plasmide avec la fusion *zntA::luxCDABE* ont été visualisées sur l'autoradiographie par des taches noires d'autant plus intenses que la concentration de HgCl_2 est élevée (figure 16). Les clones qui ne portent pas la fusion sont restés invisibles sur le film.

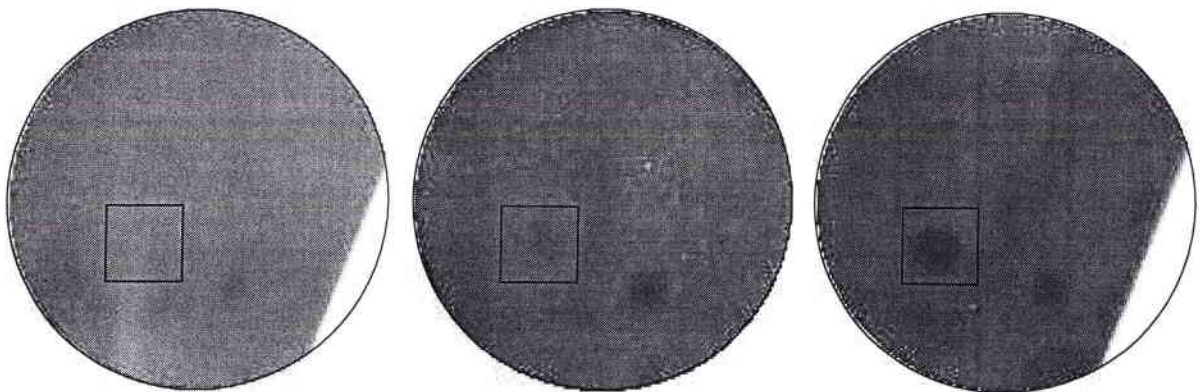


Figure 16 : Autoradiographie après 30 min d'exposition sur boîtes de Pétri avec 48 colonies de transformants des plasmides de II.1.1.

Les boîtes contiennent du milieu LB avec (de gauche à droite) 0 μM , 4 μM et 40 μM de HgCl_2 . Un clone répondant au mercure est encadré.

Les transformants positifs ont été sélectionnés, isolés et les plasmides correspondants ont été extraits puis analysés par restriction enzymatique. Un de ces plasmides, portant la fusion *zntA::lux* attendue a été choisi pour les expériences ultérieures et a été nommé pZNT::lux.

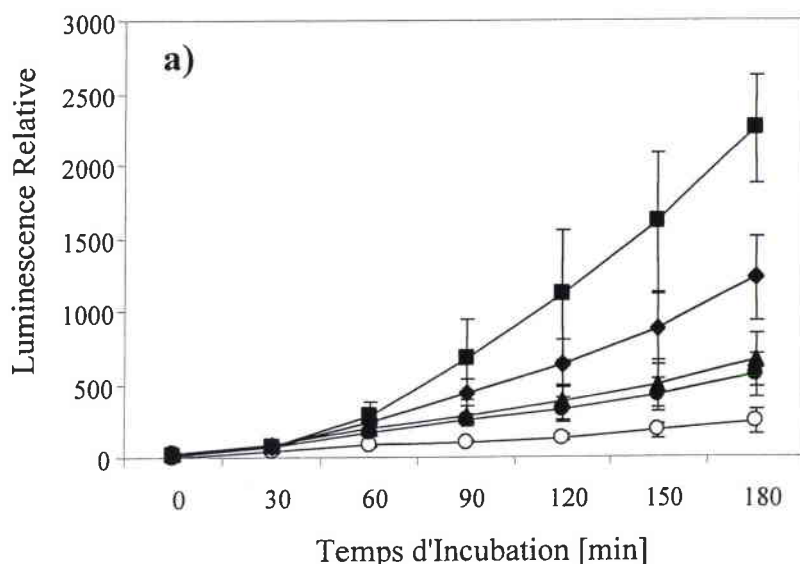
Le plasmide pZNT::lux confère donc la production de lumière quand la cellule hôte est exposée aux ions de mercure. Tenant compte des résultats de la première partie de ce chapitre, cette nouvelle fusion devrait, en plus, répondre à la présence de cadmium, de plomb et de zinc.

II.2. Mesures préliminaires

Dans un premier temps, nous avons cherché à détecter de manière qualitative la luminescence induite par la fusion *zntA::lux* dans la souche rapporteur *E. coli* DH10B/pZNT::*lux*. Ce test consiste à mesurer l'émission de lumière en présence de différentes concentrations de CdCl₂, de HgCl₂, de Pb(NO₃)₂ et de ZnSO₄. Il s'agissait de savoir s'il y a une réponse détectable par un luminomètre, et si cette réponse est dépendante de la concentration du métal ajouté.

Ainsi, une culture de DH10B/pZNT::*lux* en début de la phase exponentielle de croissance en milieu riche (LB) a été mélangée avec différentes solutions de métaux dans une microplaque à 96 puits. Cette culture a été incubée à 30°C pendant 3 heures durant lesquelles l'émission de lumière a été mesurée toutes les trente minutes.

Les résultats présentés en figure 17 montrent que DH10B/pZNT::*lux* émet de la lumière en présence de Cd(II), Hg(II), Pb(II) et Zn(II). L'évolution de la luminescence au cours du temps varie en fonction du métal inducteur et de sa concentration. Quelque soit le métal inducteur testé, le niveau de luminescence est très faible en début d'incubation (10 unités de luminescence relative), puis il augmente continuellement jusqu'à la fin de l'incubation. L'écart de la luminescence en présence et en absence de métaux lourds (niveau d'induction) augmente également en fonction du temps d'incubation. Ainsi, dans ces conditions de test, l'induction de la lumière par rapport au niveau basal est maximale après 180 min.



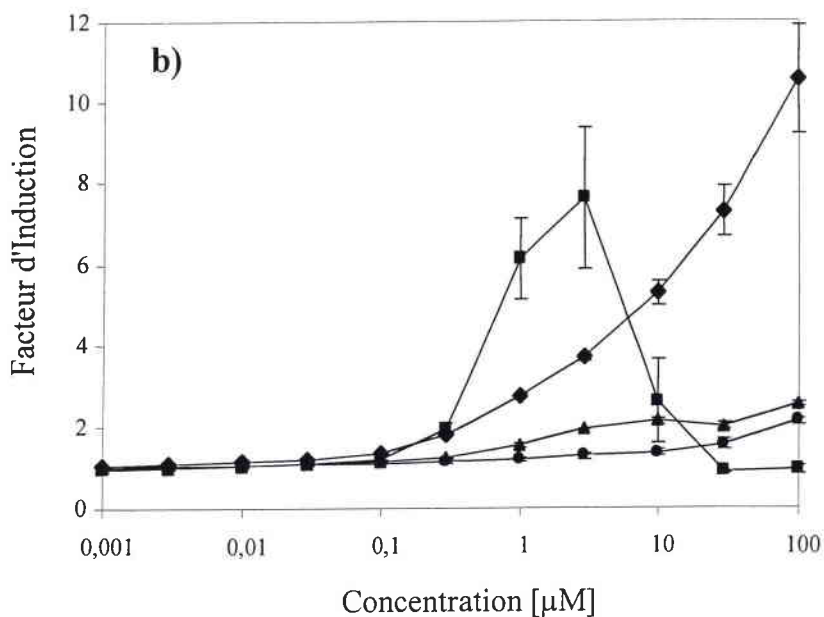


Figure 17 : Mesure de la luminescence d'*E. coli* DH10B/pZNT::lux en présence de CdCl_2 , de HgCl_2 , de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et de ZnSO_4 .

Les cellules sont cultivées dans du milieu LB jusqu'à $A_{600}=0,05$ et incubées en présence de métaux lourds aux concentrations finales indiquées ci-dessus.

a) Evolution de la luminescence en fonction du temps en absence (\circ) et en présence de $10 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (\blacklozenge), de $3 \mu\text{M}$ de HgCl_2 (\blacksquare), de $100 \mu\text{M}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (\blacktriangle), et de $100 \mu\text{M}$ de ZnSO_4 (\bullet).

b) Facteurs d'induction en fonction de la concentration en CdCl_2 (\blacklozenge), HgCl_2 (\blacksquare), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (\blacktriangle) et ZnSO_4 (\bullet) après 180 min d'incubation.

La figure 17b représente les variations de l'induction de luminescence en réponse au Cd, Hg, Pb et Zn après 3 h d'incubation. Pour ces quatre métaux, l'émission de lumière est dose-dépendante, mais les concentrations minimales détectables par DH10B/pZNT::lux sont très différentes. En effet, la luminescence de DH10B/pZNT::lux est induite en présence de mercure à partir d'une concentration de $0,3 \mu\text{M}$ et elle est maximale à $3 \mu\text{M}$. A des concentrations plus élevées, la luminescence baisse probablement en raison de la toxicité du HgCl_2 . En revanche, le plomb, le zinc et le cadmium s'avèrent moins toxiques. A des concentrations de $100 \mu\text{M}$, l'induction de la luminescence est au niveau le plus élevé pour ces trois métaux. En particulier, le cadmium induit une forte émission de lumière : à partir d'une valeur seuil de $0,3 \mu\text{M}$ jusqu'à $100 \mu\text{M}$, l'induction s'intensifie pour atteindre un niveau 10 fois plus élevé que l'expression basale de DH10B/pZNT::lux. La concentration seuil de l'induction de luminescence pour le plomb se situe à $1 \mu\text{M}$ et pour le zinc à $30 \mu\text{M}$. Ces deux métaux n'induisent que faiblement l'émission de lumière dans ces conditions de mesure.

Ainsi, pour des gammes de concentrations en métaux lourds non létales, DH10B/pZNT::lux émet d'autant plus de lumière que la concentration des métaux inducteurs est élevée.

Mais il s'agit seulement d'un premier test d'évaluation des performances de la souche rapporteur basé sur une fusion *zntA::lux*. On constate en effet que le capteur présente quelques faiblesses qui doivent être améliorées pour rendre ce test plus fiable :

- le délai nécessaire à une réponse maximale est important (180 minutes),
- la sensibilité du test pourrait être améliorée pour permettre la détection des faibles concentrations de métaux lourds ($< 1 \mu\text{M}$),
- la reproductibilité de l'essai n'est pas convenable, les écarts dépassent un intervalle d'erreur de 30%, la réponse étant probablement affectée par de nombreux facteurs extérieurs.

Afin d'obtenir une méthode d'analyse fiable en utilisant le biocapteur bactérien basé sur cette fusion, il faut supprimer ces faiblesses. L'étude des facteurs pouvant influencer la production de la luminescence sera donc le sujet de la suite de ce travail. L'objectif final était d'améliorer les conditions du test afin d'obtenir une réponse rapide, sensible et reproductible.

II.3. Etude de la réponse et standardisation du test

L'objectif de cette étape du travail est d'étudier quelques facteurs biotiques et abiotiques pouvant influencer l'expression de la fusion plasmidique *zntA::lux* dans *E. coli*. En effet, la bactérie peut s'adapter à son environnement par un changement de son expression génétique. Mais la physiologie de l'organisme réagit également aux variations de certaines conditions environnementales particulières comme, par exemple, le pH ou la température du milieu. Afin d'établir une méthode d'analyse fiable, il était crucial de connaître la réaction de la souche rapporteur - en termes de luminescence - à des conditions particulières, afin de pouvoir mettre en pratique un protocole de mesure optimisé. Nous avons donc entrepris une amélioration du test en modifiant les conditions du milieu afin d'obtenir une réponse lumineuse rapide, sensible à des faibles concentrations en métaux lourds, et reproductible.

II.3.1. Influence de la souche bactérienne

Dans un premier temps, nous avons testé si la fusion génétique portée par pZNT::lux, était exprimée différemment dans d'autres souches bactériennes. En effet, la souche *E. coli* DH10B utilisée pour les premières mesures, est avant tout une souche servant à la propagation des plasmides, mais n'est probablement pas la plus performante pour l'essai de luminescence, car elle porte un certain nombre de mutations dont on ignore l'impact sur la réponse aux métaux. Ainsi, nous avons choisi *E. coli* MG1655 comme cellule hôte de la fusion. MG1655 est une souche sauvage qui a donc été transformée par pZNT::lux. Les transformants obtenus ont ensuite été testés pour leur capacité d'émission de lumière en présence des métaux inducteurs.

L'induction de la fusion sur le plasmide pZNT::lux de la souche DH10B est comparée à celle de la souche MG1655 (Figure 18). On constate que la fusion est exprimée dans ces deux souches d'*Escherichia coli* et que la luminescence des deux cultures est d'autant plus importante que la concentration des métaux ajoutés augmente. Bien que les profils des histogrammes soient comparables pour les souches DH10B et MG1655, le facteur d'induction varie légèrement.

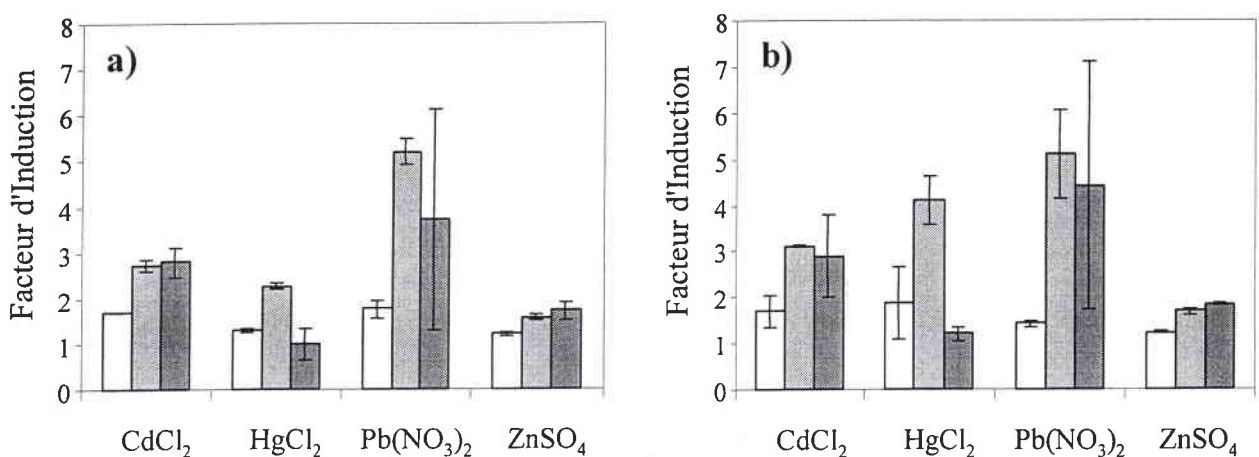


Figure 18 : Induction de luminescence d'*E. coli* DH10B/pZNT::lux (a) et MG1655/pZNT::lux (b) par des métaux lourds.

Les souches DH10B/pZNT::lux et MG1655/pZNT::lux ont été cultivées dans du milieu LB jusqu'à $A_{600}=0,1$, puis incubées avec 0,1 µM (barres blanches), 1 µM (barres grises claires) et 10 µM (barres grises foncées) de CdCl₂, HgCl₂, Pb(NO₃)₂ et ZnSO₄. Les facteurs d'induction ont été calculés après 2 h d'incubation, car la lumière émise était maximale à ce délai.

Dans ces conditions de test, on observe que MG1655 semble présenter une meilleure induction en présence de mercure, mais les écarts types sont trop importants pour une interprétation significative. Ainsi, les résultats ne démontrent pas qu'une des deux souches répond plus sensiblement à la présence des métaux, mais ils confirment que le test est possible avec la souche sauvage. Pour la suite des expérimentations, les mesures de luminescence seront donc effectuées avec la souche MG1655/pZNT::lux.

Une autre question qui se pose est de savoir si la fusion *zntA::lux* peut être exprimée dans une autre espèce procaryote que *Escherichia coli*. Nous avons choisi une bactérie du sol, la souche *Pseudomonas fluorescens* DF57 (Kragelund *et al.*, 1997), pour tester son aptitude à réguler l'expression de *zntA* en fonction des métaux lourds présents dans le milieu. La souche *Pseudomonas fluorescens* DF57 a été transformée par le plasmide pZNT::lux. Les transformants sélectionnés ont ensuite été soumis à un test de luminescence sur milieu LB. Mais, pour une gamme de concentration comprise entre 0,1 μM à 100 μM , aucun des transformants n'a répondu à la présence d'un des 4 métaux inducteurs.

II.3.2 Influence du milieu de culture

Dans cette partie, nous avons donc étudié l'impact de la composition du milieu de culture sur l'expression de la fusion *zntA::lux* de la souche rapporteur en présence des quatre métaux inducteurs.

Jusqu'à présent, la cellule rapporteur a été cultivée dans le milieu riche Luria Bertani (LB). Ce milieu a été développé pour assurer une bonne croissance de cultures bactériennes, notamment d'*E. coli*. Mais ce milieu présente également des inconvénients : comme la plupart des milieux riches, LB contient des substances organiques, comme l'extrait de levure ou le tryptone dont la composition exacte est variable, ainsi que du phosphate inorganique, qui peuvent chélater ou précipiter des métaux lourds et les rendre ainsi indisponibles pour la bactérie (Barkay *et al.*, 1997).

Dans un premier temps, nous avons remplacé le milieu LB par un milieu synthétique, d'une composition bien définie, afin de rester toujours dans des conditions de test identiques. Nous avons choisi des milieux minimum qui limitent la croissance bactérienne. L'objectif était de stabiliser la quantité de cellules dans l'échantillon à tester, de sorte que le développement de

MG1655/pZNT::lux n'interfère pas avec sa réponse aux métaux lourds. Ben-Israel *et al.* (1998) ont proposé une simple solution de sels (milieu minimum MN) qui simule la dureté potentielle d'un échantillon aqueux naturel. Cette solution est tamponnée (pH 6,9), mais elle ne contient aucune source de carbone, de phosphate ou d'azote, ce qui empêche toute multiplication bactérienne.

L'évolution de la luminescence de MG1655/pZNT::lux dans du milieu MN est représentée en figure 19a. L'émission de lumière augmente dès le début de l'incubation pour atteindre son maximum après 120 minutes. Puis, la luminescence diminue progressivement jusqu'à la fin de la mesure. Le profil des courbes est le même pour les 4 métaux comme pour le témoin. En ce qui concerne l'induction par les métaux, les valeurs restent faibles (figure 19b). Les facteurs d'induction vont du simple au double en présence de cadmium et de plomb. Pour le mercure et le zinc, les valeurs sont même inférieures à 1,5.

En revanche, lorsqu'elle est incubée dans du milieu MN, la souche MG1655/pZNT::lux émet de la lumière en réponse à de plus faibles concentrations de métaux que lorsqu'elle est incubée dans du milieu LB (figure 17). Mais la toxicité est accrue : la chute du facteur d'induction à des quantités de métaux plus élevées suggère la mort cellulaire. 1 μM de Hg(II) s'avère donc toxique pour la bactérie, de même que 10 μM de Pb(II), et 30 μM de Cd(II) ou de Zn(II). Nous pouvons donc conclure que la sensibilité aux métaux lourds du biocapteur est plus élevée dans le milieu minimum MN que dans le milieu LB.

Un deuxième essai a été entrepris avec le même milieu, mais cette fois-ci, les bactéries ont été directementensemencées à partir du LB au 1/10 sans centrifugation. Cette culture de MG1655/pZNT::lux montre une évolution de la luminescence différente par rapport à la mesure effectuée dans du milieu MN pur (figure 20a). Pendant les 4 heures de mesure, l'émission de lumière s'intensifie continuellement et ne semble pas atteindre de maximum. En absence de métal, la pente est moindre et l'induction est donc plus accentuée qu'en figure 19. Cet écart entre le témoin sans inducteur et les courbes avec inducteur s'intensifie tout le long de la mesure.

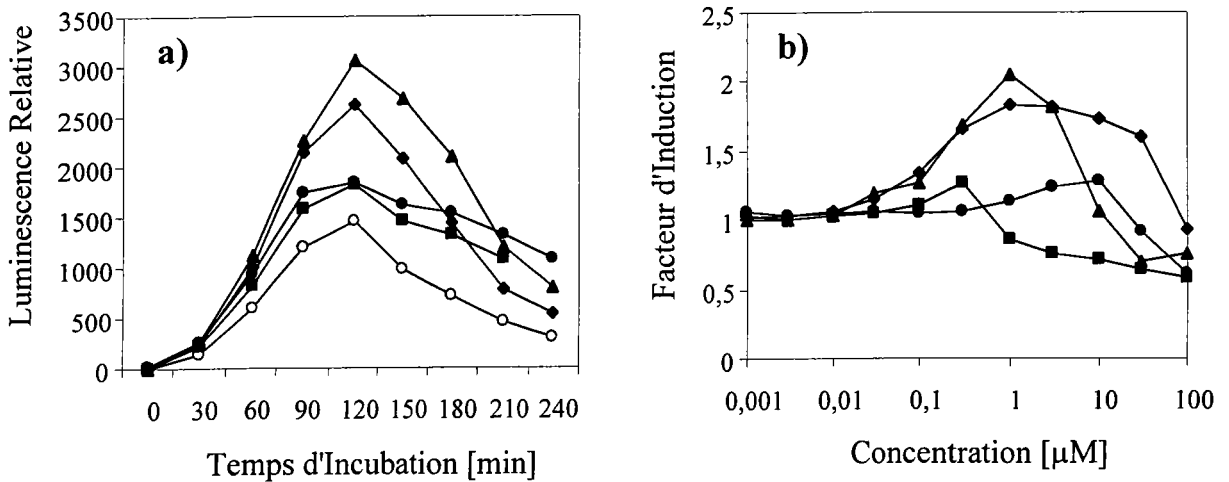


Figure 19 : Réponse de MG1655/pZNT::lux dans du milieu MN en présence de CdCl₂, HgCl₂, Pb(NO₃)₂ et ZnSO₄.

Les cellules ont été cultivées dans du LB jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance, concentrées par centrifugation et enfin reprises dans du milieu MN à la densité optique $A_{600}=0,05$.

- a) L'évolution de la luminescence au cours du temps en absence (○) et en présence de 3 μM de CdCl₂ (◆), de 0,3 μM de HgCl₂ (■), de 1 μM de Pb(NO₃)₂ (▲) et de 10 μM de ZnSO₄ (●).
 b) Facteur d'induction après 150 minutes d'incubation en fonction de la concentration de métaux lourds CdCl₂ (◆), HgCl₂ (■), Pb(NO₃)₂ (▲) et ZnSO₄ (●) ajoutés.

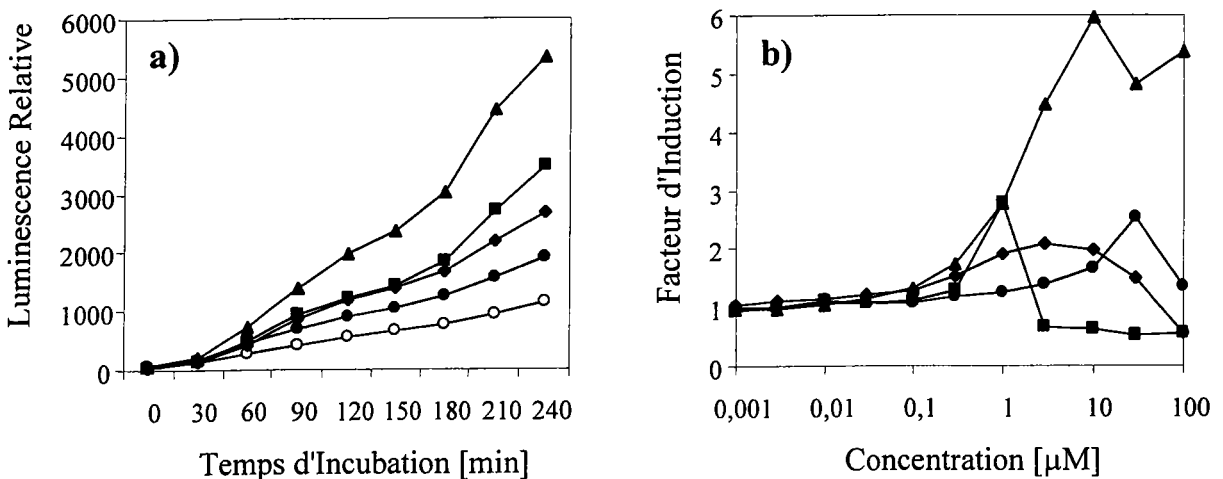


Figure 20 : Réponse d'une culture de MG1655/pZNT::lux dans du milieu MN avec 10% de LB en présence de CdCl₂, HgCl₂, Pb(NO₃)₂ et ZnSO₄.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu LB jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance et diluées au 1/10 dans du milieu MN ($A_{600}=0,01$).

- a) Cinétique de l'émission de lumière en absence (○) et en présence de 3 μM de CdCl₂ (◆), de 1 μM de HgCl₂ (■), de 3 μM de Pb(NO₃)₂ (▲) et de 10 μM de ZnSO₄ (●).
 b) Facteur d'induction après 240 minutes d'incubation en fonction de la concentration de métaux lourds CdCl₂ (◆), HgCl₂ (■), Pb(NO₃)₂ (▲) et ZnSO₄ (●) ajoutés.

Après 4 h d'incubation, les facteurs d'induction ont été calculés (figure 20b), et on observe que la présence du plomb induit l'expression de la fusion à un niveau 6 fois plus élevé que l'expression basale ; pour les autres métaux, on observe un facteur d'induction compris entre 2 et 3. Le niveau d'induction est ainsi légèrement plus élevé que dans la mesure précédente, notamment en réponse au plomb. En revanche, la présence du cadmium n'influence que très faiblement la réponse. Enfin, la réponse au mercure et au zinc semble plus importante qu'en figure 19.

Les différences entre les mesures présentées en figures 19 et 20 indiquent la nécessité d'utiliser un milieu de culture qui contient des substances nutritives ; les bactéries semblent répondre significativement à condition que leur métabolisme ne soit pas trop affaibli.

Une alternative aux milieux utilisés précédemment est le milieu GGM (Glucose-Glycérophosphate Medium) proposé par Poole *et al.* (1989). Ce milieu synthétique est complété avec tous les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne mais dépourvu de phosphates inorganiques qui peuvent précipiter des cations métalliques et les rendre ainsi indisponibles pour l'organisme (Hughes et Poole, 1991). Ainsi, pour le test suivant, la souche MG1655/pZNT::lux a été cultivée dans du GGM jusqu'en phase exponentielle de croissance avant de l'incuber avec les métaux.

L'évolution de la luminescence au cours du temps est représentée en figure 21a-d. La réponse s'avère rapide : très tôt, l'induction de l'émission de lumière est déclenchée et un maximum de luminescence est atteint après un temps de latence de 60 à 90 minutes. Puis, la luminescence diminue jusqu'à la fin de la mesure. Pendant les premières 60 min de la mesure, les écarts-types dépassent souvent un intervalle d'erreur de 30% ; alors qu'après 90 min, les écarts-types diminuent. Comme la réponse de MG1655/pZNT::lux est immédiate dans ces conditions de test, la reproductibilité est difficile, notamment en début de la mesure. En effet, la préparation des échantillons de mesure a été effectuée à température ambiante et durant une période entre 5 à 10 min. Ainsi, un léger refroidissement de la culture bactérienne peut entraîner un délai de la réponse. Les facteurs d'inductions en figure 22 ont donc été calculés après 90 min d'incubation.

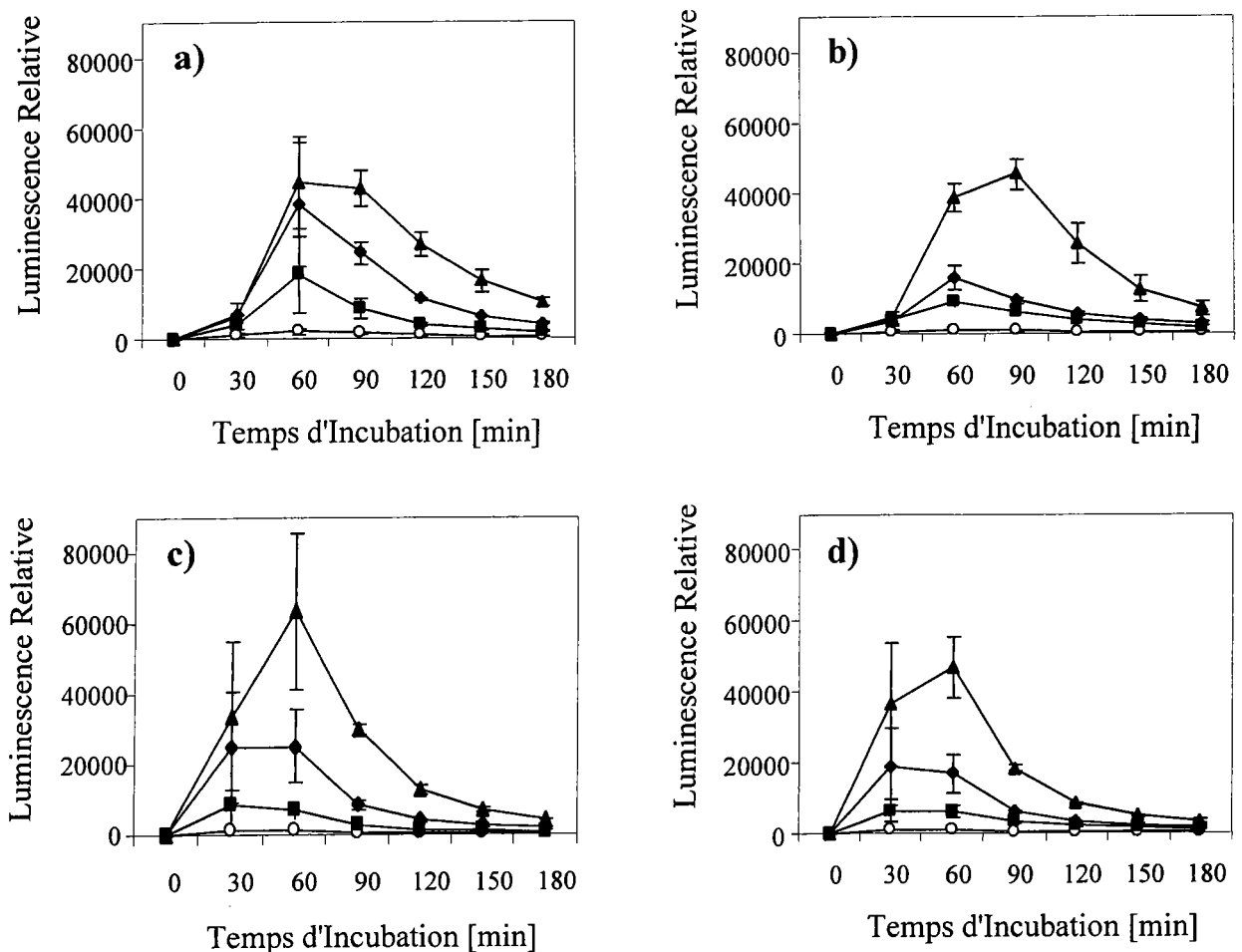


Figure 21 : Evolution de la luminescence de MG1655/pZNT::lux en fonction du temps d'incubation avec des métaux lourds.

Des précultures dans du LB sont diluées au 1/50 dans du GGM, et les cultures sont incubées jusqu'à $A_{600}=0,2$ avant d'y ajouter

- a) du CdCl₂ (○ 0 μM, ◆ 0,01 μM, ■ 0,03 μM, ▲ 0,1 μM)
- b) du HgCl₂ (○ 0 μM, ◆ 0,1 μM, ■ 1 μM, ▲ 10 μM)
- c) du Pb(NO₃)₂ (○ 0 μM, ◆ 0,03 μM, ■ 0,1 μM, ▲ 0,3 μM)
- d) du ZnSO₄ (○ 0 μM, ◆ 1 μM, ■ 3 μM, ▲ 10 μM).

L'amplitude d'induction est plus élevée que dans les milieux utilisés précédemment (milieux LB et MN, Figures 17 ; 19 ; 20). Les facteurs d'induction (figure 22) atteignent une valeur de 65 pour le zinc (à 30 μM), de 50 pour le mercure (à 10 μM), de 35 pour le plomb (à 0,3 μM) et de 30 pour le cadmium (0,1 μM). Nous pouvons également constater que le test est plus sensible aux faibles concentrations de métaux lourds dans le milieu GGM. Si on présume que le seuil de détection se situe à la concentration qui induit la luminescence d'un facteur 4 par rapport au niveau basal (en absence de métaux), le CdCl₂ est détectable à partir d'une concentration finale de 0,01 μM. Pour le Pb(NO₃)₂ et le HgCl₂, le seuil de détection se situe à 0,03 μM, et la présence de ZnSO₄ est détectée à partir de 0,1 μM.

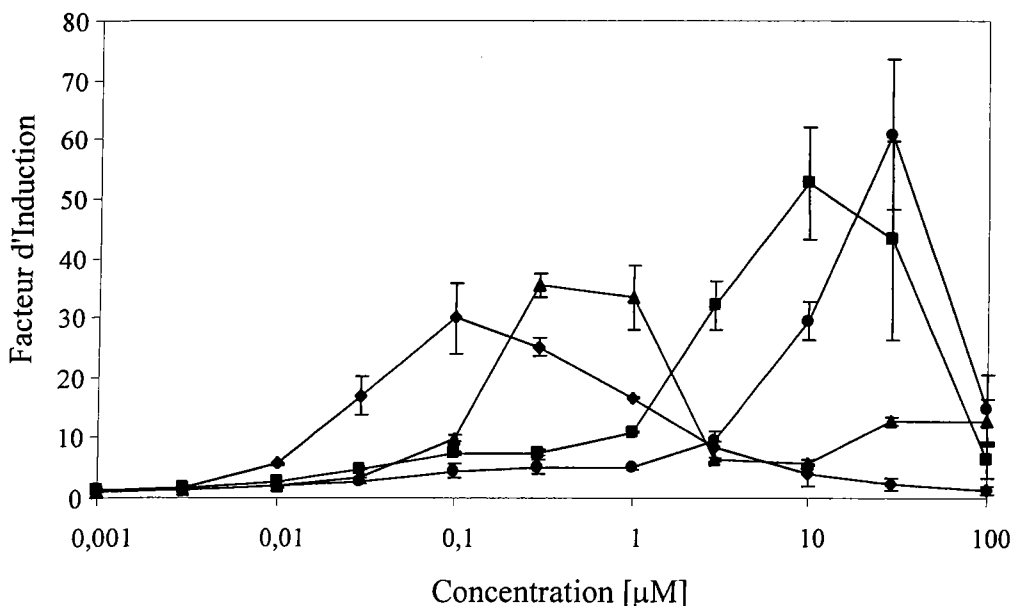


Figure 22 : Facteurs d'induction en fonction des concentrations de métaux lourds.

Les conditions de culture sont décrites en figure 21, les facteurs d'induction sont calculés après 90 minutes d'incubation.

On peut également constater en figure 22 que les écart-types se recouvrent d'une concentration à l'autre. Dans le cas du cadmium, par exemple, le chevauchement des barres d'erreur s'étend à une fourchette de concentrations qui sont 10 fois plus élevées. Cette imprécision d'une mesure à l'autre est l'inconvénient majeur en vue du développement d'un test permettant la détermination des quantités précises de métaux lourds. Les conditions de culture doivent être absolument identiques, sinon la reproductibilité de l'essai ne peut pas être correcte. Dans la suite de ce travail, nous avons donc analysé l'influence des conditions de culture sur la réponse de MG1655/pZNT::lux et l'induction de la luminescence par les métaux.

II.3.3. Influence de la phase de croissance

Le développement d'une culture bactérienne se déroule en plusieurs phases qui sont bien visibles en figure 23. A la phase de croissance initiale très lente (les deux premières heures de cultures), succède la phase exponentielle de croissance (entre 2 et 8 heures de cultures) pendant laquelle la division cellulaire se déroule plus rapidement et la physiologie bactérienne est très active. Suite à cette phase de croissance exponentielle, les cellules entrent en phase

stationnaire. Selon la phase et la vitesse de développement d'une culture, il peut y avoir de grandes variations au niveau de sa physiologie cellulaire et donc au niveau de l'expression génétique de la bactérie. Par exemple, une cellule d'*Escherichia coli* en phase de développement rapide (cycle cellulaire de 24 minutes) contient 2,5 fois plus d'ADN, 5 fois plus de protéines et 10 fois plus d'ARN qu'une cellule en cycle cellulaire de 100 minutes (Bremer et Dennis, 1996).

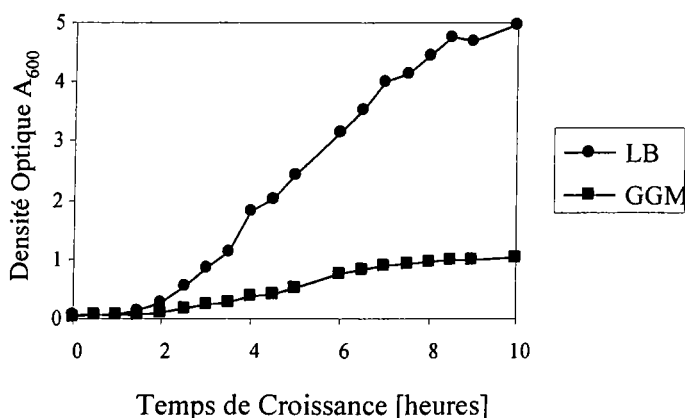


Figure 23 : Croissance de MG1655/pZNT::lux dans du milieu LB et GGM.

Une préculture dans du milieu LB est diluée au 1/50 dans les milieux respectifs.

Jusqu'à présent, nous avons utilisé des cultures en début de la phase exponentielle de croissance à une densité optique comprise entre $A_{600}=0,1$ et $0,2$. Mais les résultats obtenus dans ces conditions de cultures n'étaient pas toujours reproductibles. En effet, chaque changement de température ou une dilution de la culture pouvait entraîner un ralentissement ou une accélération de la croissance bactérienne susceptible de modifier la réponse lumineuse.

Ainsi, une préculture de MG1655/pZNT::lux en milieu LB en phase stationnaire a été concentrée par centrifugation et reprise dans du milieu LB frais en ajustant la densité cellulaire à $A_{600}=0,05$. Les cellules ont ensuite étéensemencées au 1/50 dans du milieu GGM avant d'être incubées avec les métaux lourds. D'après les résultats présentés dans le paragraphe III.3.2., cette quantité de LB (2%) dans le milieu GGM semblait favoriser une réponse rapide et intense de la souche rapporteur. Un essai similaire réalisé à partir de cellules précultivées dans du milieu GGM et diluées dans le même milieu GGM ne répond qu'après 7 heures d'incubation, et l'induction de l'expression de *zntA::lux* est infime (résultats non-présentés).

La réponse de MG1655/pZNT::lux a été mesurée en fonction du temps de culture. A des intervalles de temps distincts, les cellules ont été prélevées et incubées avec les métaux inducteurs à une concentration précise. En figure 24, on peut observer que, pour tous les métaux, l'induction de la luminescence baisse au cours du temps de culture. En effet, après 2 heures de culture, l'induction de la luminescence est diminuée considérablement et cette diminution se poursuit ultérieurement. A l'entrée de la phase stationnaire, après 7 heures de culture, aucune induction de luminescence ne peut être observée, le facteur d'induction est de 1. Ainsi, à la phase de culture stationnaire, MG1655/pZNT::lux ne répond plus à la présence des 4 métaux.

En revanche, le temps de latence - le délai entre le début de l'incubation avec les métaux et la réponse maximale - diminue en fonction du temps de culture. Au début de la culture, ce délai est de 120 min, alors qu'après 2 h de culture, le temps de latence est diminué de 50% et après 4 h, l'amplitude d'induction la plus intense est atteinte à 40 min d'incubation.

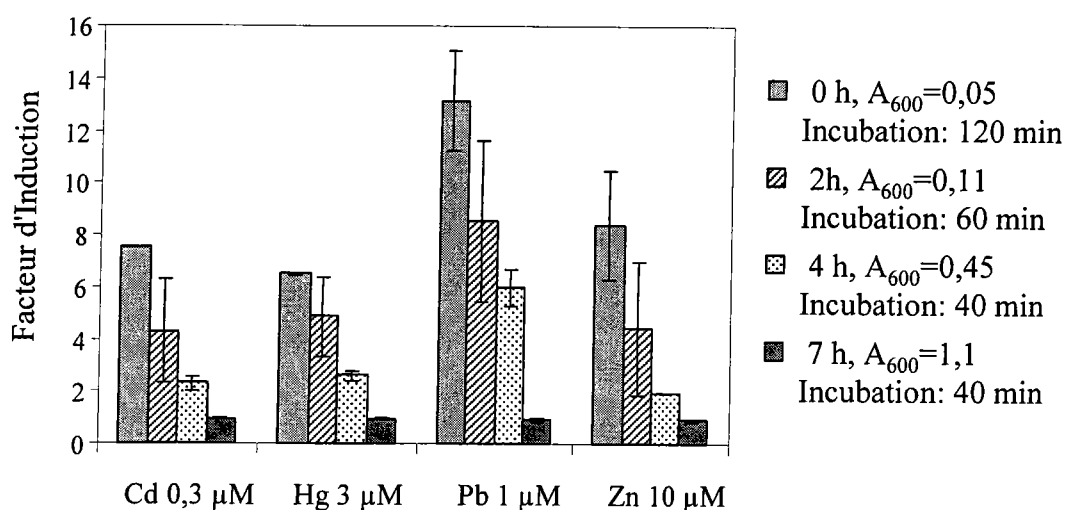


Figure 24 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en fonction du temps de culture.

Le temps de culture et la densité optique correspondante sont présentés à droite de la figure. Le temps d'incubation avec les métaux lourds en fonction du temps de culture est également indiqué.

Les cellules qui ont été incubées avec les métaux immédiatement après la mise en culture dans du milieu GGM répondent le plus intensivement à la présence de métaux lourds. Avec le temps de culture, la réponse de MG1655/pZNT::lux aux métaux est fortement diminuée. Dans la suite de ce travail, les cellules seront donc directement reprises après centrifugation pour les essais de bioluminescence.

II.3.4 Influence de la densité cellulaire

L'objectif de ce paragraphe est d'analyser l'influence de la densité cellulaire d'un échantillon sur l'émission de lumière de la souche MG1655/pZNT::lux. Nous avons testé la réponse de MG1655/pZNT::lux aux métaux lourds selon les conditions établies dans les paragraphes précédents, mais avec des cultures présentant des densités optiques variées.

Les résultats présentés en figure 25 montrent que la luminescence augmente avec la densité optique jusqu'à $A_{600}=0,5$. Entre $A_{600}=0,05$ et $A_{600}=0,2$, la lumière émise est quasi proportionnelle à la quantité de cellules présentes dans le milieu de mesure. Pour des densités cellulaires comprises entre $A_{600}=0,2$ et $A_{600}=0,5$, l'augmentation de luminescence est plus faible, surtout en présence de Cd(II), Hg(II) et Pb(II). Enfin, l'émission de lumière décroît en présence de tous les métaux à une densité optique de $A_{600}=1$ et en absence de métaux à partir de $A_{600}=0,5$.

Le temps de latence, c'est-à-dire le délai nécessaire pour obtenir l'induction maximale de luminescence, est également variable en fonction de la densité cellulaire. Pour de faibles concentrations bactériennes, le temps de latence fluctue entre 100 et 130 minutes selon le métal inducteur. Ce délai diminue en présence d'une quantité de cellules plus importante. Par exemple, en présence de 1 μM de plomb, le temps de latence diminue de 80 minutes entre $A_{600}=0,2$ et $A_{600}=1$. En absence de métaux, le temps de latence est stable (80 minutes).

Nous estimons que les mesures effectuées à une densité optique $A_{600}=0,2$ s'avèrent un bon compromis entre rapidité de l'essai et intensité de l'émission de lumière pour les essais de bioluminescence avec MG1655/pZNT::lux. L'intensité et l'induction de la luminescence sont importantes à cette concentration ; une densité cellulaire plus élevée induit une augmentation de la turbidité de la culture qui est défavorable pour la mesure. De plus, comme les cellules sont capables d'adsorber des cations sur leur paroi et de les immobiliser ainsi, on limitera la densité optique des cultures à $A_{600}=0,2$ pour la suite de ce travail.

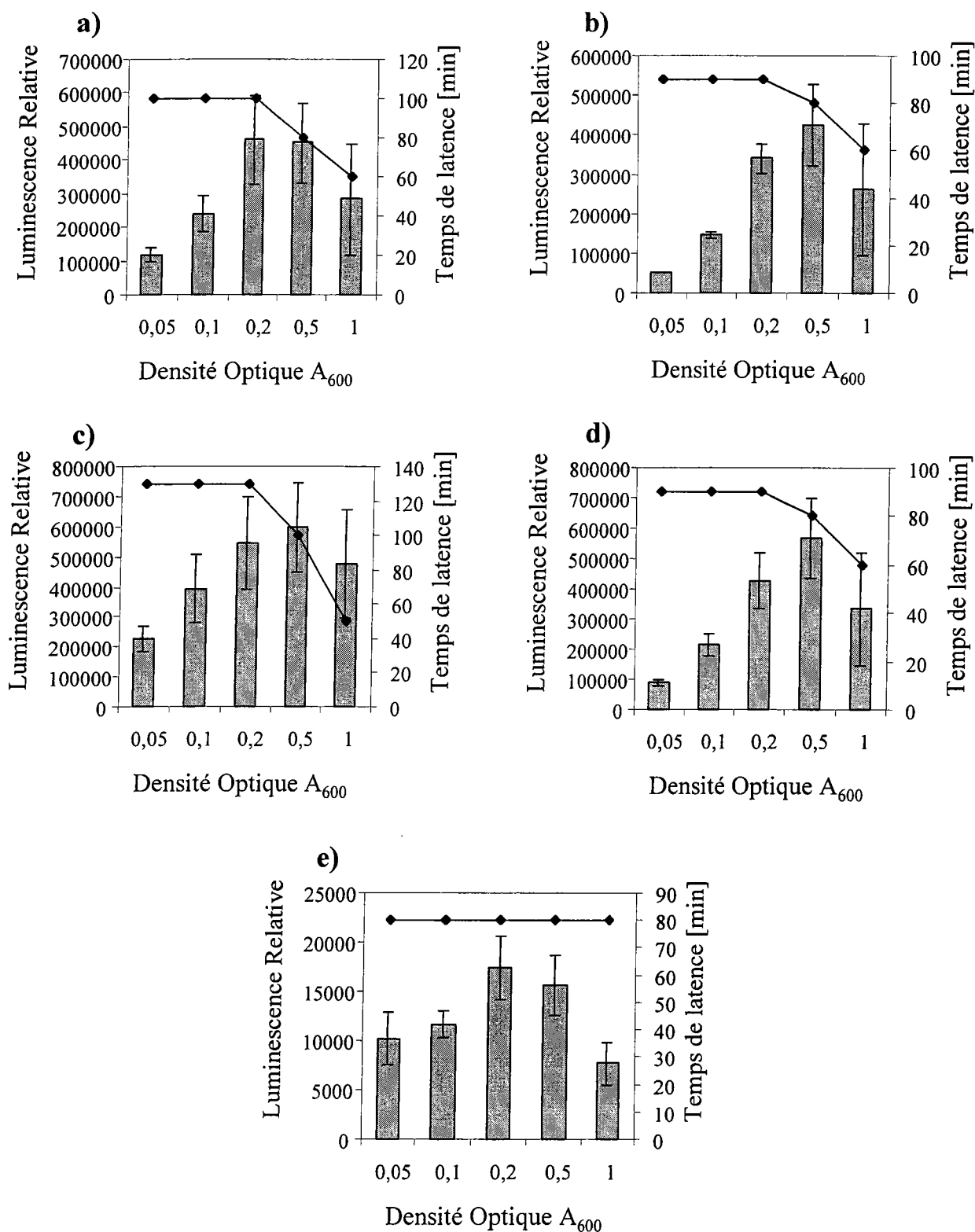


Figure 25 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en présence de métaux lourds à différentes densités cellulaires.

La luminescence relative a été mesurée en fonction de différentes densités optiques (histogrammes). Le temps de latence décrit le délai entre le début de l'incubation et le maximum de luminescence (courbes). Les cultures sont incubées avec a) $CdCl_2$ (0,3 μM), b) $HgCl_2$ (3 μM), c) $Pb(NO_3)_2$ (1 μM) et d) $ZnSO_4$ (10 μM) ; e) représente la luminescence en absence de métaux.

II.3.5 Influence de l'acidité du milieu

L'objectif du test de bioluminescence qui a été développé dans ce travail est de détecter des quantités de métaux lourds qui sont disponibles pour les organismes vivants. Cette biodisponibilité des ions métalliques en solution aqueuse dépend fortement du pH de cette solution. L'acidité du milieu est donc un des facteurs abiotiques qui influence la disponibilité des ions métalliques pour des bactéries. Ainsi, la réponse de la souche rapporteur MG1655/pZNT::lux en présence de cadmium, de mercure, de plomb et de zinc a été testée en fonction du pH du milieu.

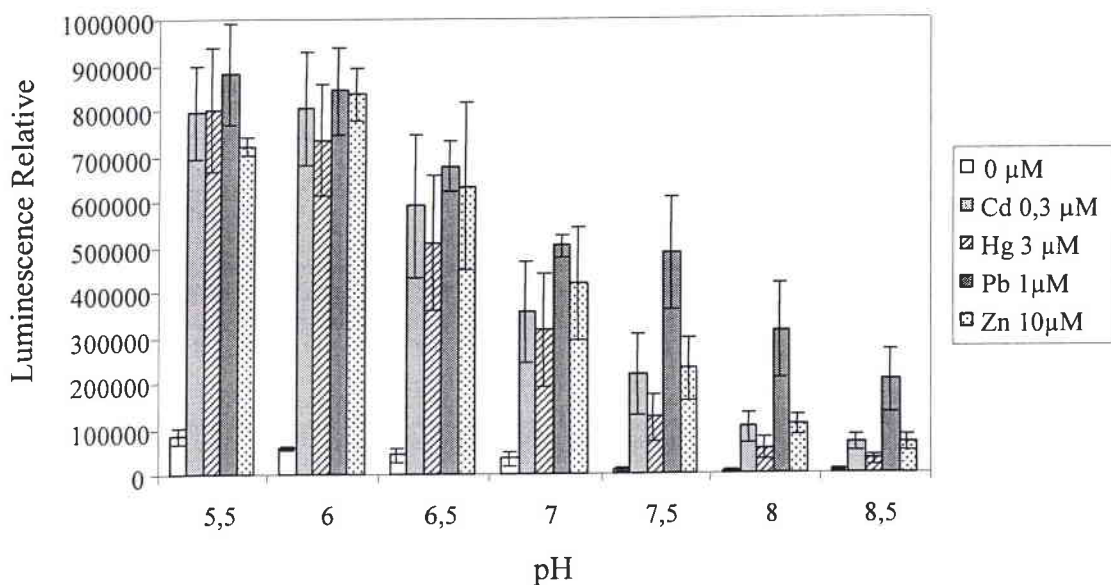


Figure 26 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en fonction de l'acidité du milieu.

La préculture est centrifugée et diluée dans du GGM tamponné aux différents pH indiqués ci-dessus. Les cultures résultantes sont incubées avec les métaux lourds pendant 80 minutes.

Comme présenté en figure 26, une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5 a été utilisée pour déterminer l'influence du pH sur la production de lumière de MG1655/pZNT::lux. La tendance générale est que la production de lumière est d'autant plus forte que l'acidité du milieu augmente. Pour des valeurs de pH comprises entre 5,5 et 7, les 4 métaux testés induisent de façon similaire. Pour des valeurs de pH plus élevées, la décroissance de luminescence est plus faible pour le plomb que pour les autres métaux. Notons qu'en absence de métaux, la luminescence est également maximale à pH 5,5 et l'intensité baisse avec l'augmentation du pH. La croissance cellulaire n'était pas affectée par les différents pH ; pour

la gamme de pH testée, la densité optique des cultures n'a pas montré des variations plus fortes que 5% après 3 h d'incubation, indiquant ainsi que la croissance des cellules n'était pas affectée.

Ce test nous a permis de montrer à quel pH MG1655/pZNT::lux émet le plus de lumière. Nous avons considéré que pour la réalisation de notre essai, le pH 6,5 donne des résultats satisfaisants : la réponse de la souche rapporteur à la présence de métaux est importante et la luminescence est intense. De plus, ce pH presque neutre permet à la bactérie de se développer normalement. Dans la suite de ce travail, on utilisera donc du milieu GGM ajustée à un pH 6,5.

II.4 Mesure après le processus de standardisation

Au vu des résultats obtenus, nous avons conçu un protocole expérimental standard comme présenté dans le logigramme ci-dessous.

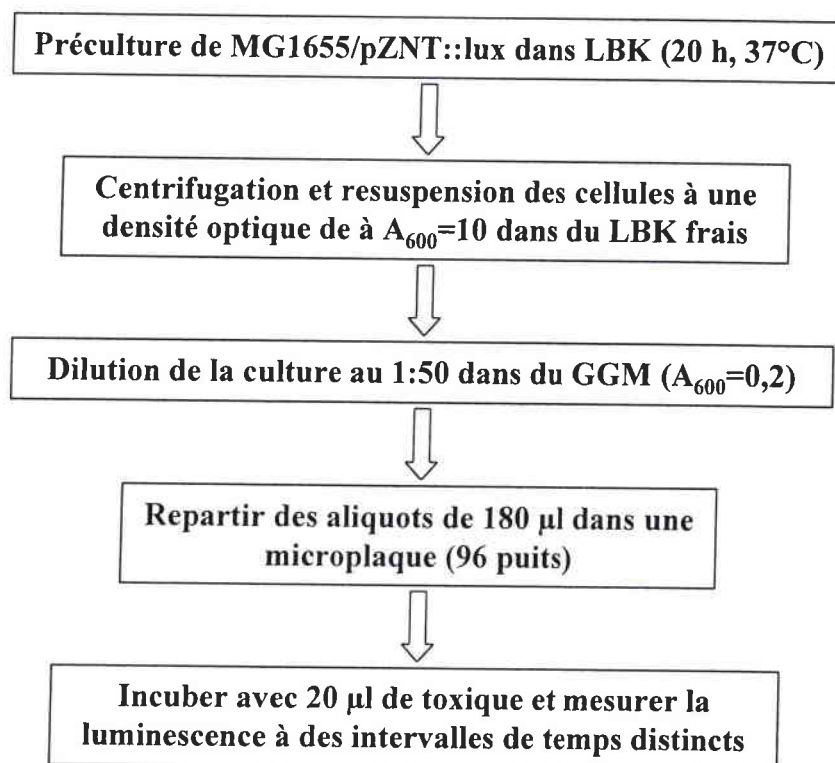


Figure 27 : Processus de mesure de bioluminescence basé sur MG1655/pZNT::lux.

Par rapport aux mesures préliminaires du paragraphe II.2 (page 81), ce nouveau protocole est mieux adapté pour la détection de faibles quantités en Cd(II), Hg(II), Pb(II) et Zn(II) dans un échantillon aqueux. Les résultats des mesures sont présentés en figures 28 et 29.

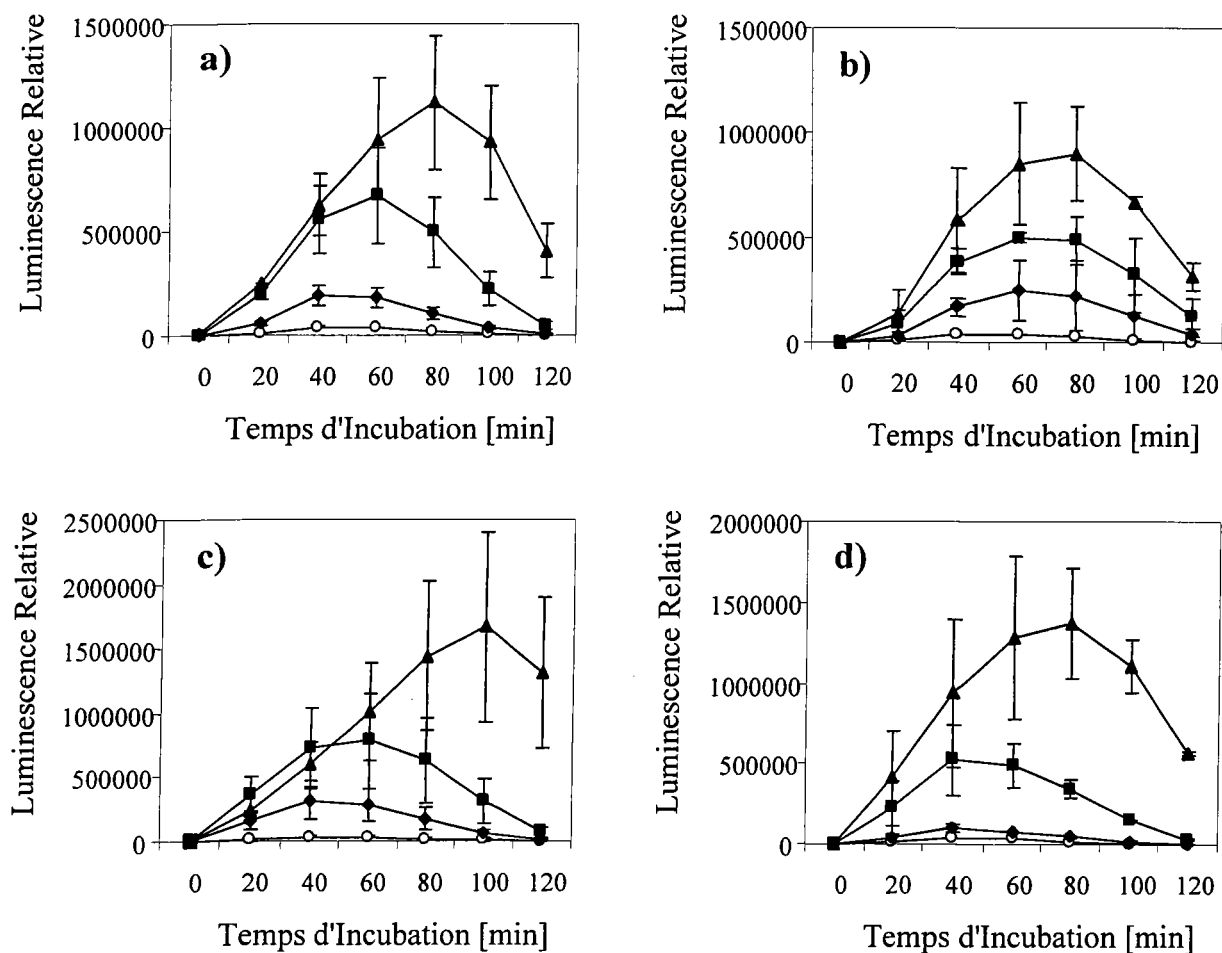


Figure 28 : Cinétique de la bioluminescence de MG1655/pZNT::lux selon le protocole standardisé.

Une culture de MG1655/pZNT::lux a été incubée avec des concentrations en métaux lourds ajoutées comme indiqué ci-dessous :

a) CdCl_2 (○ 0 μM , ◆ 0,01 μM , ■ 0,03 μM , ▲ 0,3 μM),

b) HgCl_2 (○ 0 μM , ◆ 0,3 μM , ■ 1 μM , ▲ 3 μM),

c) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (○ 0 μM , ◆ 0,03 μM , ■ 0,1 μM , ▲ 1 μM),

d) ZnSO_4 (○ 0 μM , ◆ 0,3 μM , ■ 3 μM , ▲ 30 μM).

Après la mise en contact de la souche MG1655/pZNT::lux avec les métaux lourds, l'intensité de la lumière augmente progressivement pendant 60 à 100 minutes d'incubation (figure 28). Le délai nécessaire à l'obtention d'une luminescence maximale varie en fonction de la concentration du métal. On observe donc que ce délai augmente avec la concentration du métal ajouté, et varie également en fonction du type de métal testé. Par exemple, la latence en présence de 1 μM de plomb est de 100 minutes, alors qu'elle est de 80 minutes en réponse à 1 μM de mercure. Les valeurs présentées en figure 29 correspondent à un temps d'incubation de

80 min. Nous estimons que ce délai était le meilleur pour l'efficacité du test en présence de tous les métaux.

Les écarts-types indiquent des fortes variations de luminescence des différentes cultures de MG1655/pZNT::lux utilisées. La reproductibilité en terme de luminescence relative est difficile, mais les écarts sont moins importants lorsque les facteurs d'induction sont présentés (figure 29).

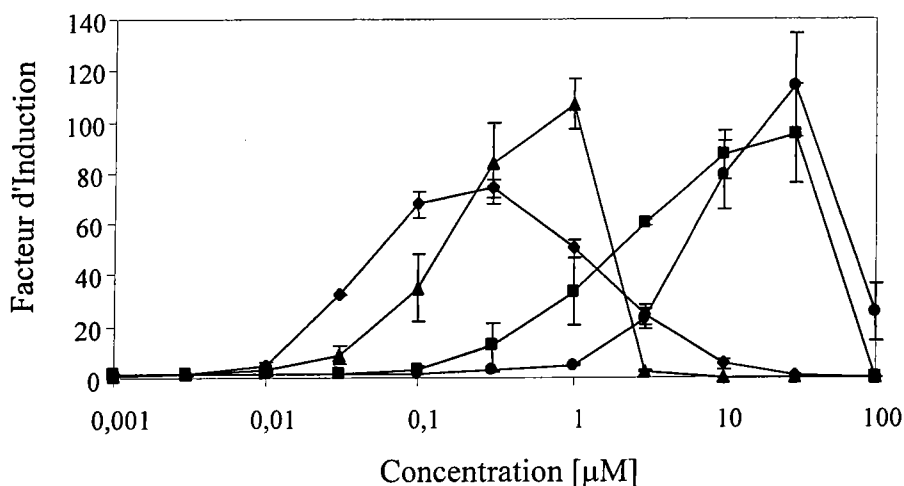


Figure 29 : Induction de la bioluminescence de MG1655/pZNT::lux en selon le protocole standardisé.

Des cultures de la souche rapporteur ont été incubées avec différentes concentrations de CdCl₂ (◆), de HgCl₂ (■), de Pb(NO₃)₂ (▲) et de ZnSO₄ (●). Les facteurs d'induction ont été calculés après 80 minutes d'incubation.

En figure 29, on observe que le cadmium induit une production croissante de lumière pour des concentrations variant entre 0,01 µM et 0,3 µM. A cette dernière concentration, la luminescence est 80 fois plus élevée par rapport au niveau de base. La présence de plomb est détectable dans une gamme de concentrations comprises entre 0,03 µM et 1 µM, et l'induction maximale atteint un facteur 90 par rapport au témoin. Le seuil de détection du mercure se situe à 0,1 µM et on observe une augmentation de l'induction dans une large gamme jusqu'à 30 µM. Au-delà, la toxicité du HgCl₂ provoque une chute de luminescence. Le facteur d'induction est maximal en présence de 10 µM de Hg(II). Enfin, le zinc est détectable à partir d'une concentration de 0,3 µM et, dans nos conditions de mesures, son seuil de toxicité est de 30 µM. Quant au facteur d'induction, il atteint 90 avec 30 µM de Zn(II).

II.5. Discussion

Nous avons créé une fusion génétique entre les séquences régulatrices du gène *zntA* et les gènes *luxCDABE* de plasmide pUCD615, soumettant ainsi l'expression des gènes *lux* au contrôle transcriptionnel d'un gène répondant aux métaux lourds. Cette régulation se traduit par une production de lumière lorsque la souche rapporteur portant ce plasmide est exposée aux ions métalliques de cadmium, mercure, plomb et zinc. Avec cette fusion *zntA::lux*, nous nous sommes donc approprié un mécanisme biologique sensible pour détecter la présence de métaux lourds. Il est donc possible de mesurer la présence d'une certaine gamme de concentrations de ces métaux à l'aide d'un luminomètre. Cependant, les concentrations détectables avec ce type de biocapteur ne dépendent pas uniquement de la concentration du métal même, mais aussi des facteurs biotiques et abiotiques auxquels la souche rapporteur est exposée.

Les gènes *luxCDABE* que nous utilisons codent pour les enzymes nécessaires à la réaction de bioluminescence (Meighen, 1991). Cette réaction enzymatique nécessite un apport d'oxygène de l'environnement extérieur. Pour minimiser les variations des concentrations en oxygène, les tests de bioluminescence sont effectués dans des microplaques à 96 puits non-couvertes avec le même volume d'essai. Nous n'avons pas testé l'influence de la concentration en oxygène sur la réponse lumineuse, mais il s'avère que dans les conditions d'essai utilisées, l'apport en O₂ est suffisant pour permettre une production lumineuse suffisante.

La température du test a été fixée à la température maximale tolérable (30°C) pour la luciférase de *Vibrio fischeri*. A des températures plus élevées, l'activité de la luciférase décline rapidement chez *E. coli* (Steward et Williams, 1992). Les précultures, par contre, ont été généralement incubées à 37°C. D'une part, ce traitement permet un développement bactérien plus rapide, d'autre part, aucune accumulation de luciférase intracellulaire active ne se produit dans ces conditions et l'induction de la fusion génétique peut être observée dès le début de l'incubation à 30°C.

Ainsi, le système *lux* utilisé dans pZNT::*lux* peut être exprimé de façon relativement stable. Les variations observées dans le test sont certainement dues à des changements physiologiques non-déterminés. Nous avons donc procédé de manière systématique pour améliorer la réponse de la souche rapporteur.

Pour minimiser les interactions imprévisibles en cis et en trans de la régulation génétique de la fusion, nous avons décidé d'utiliser une souche sauvage, *E. coli* MG1655, à la place de DH10B comme bactérie hôte du plasmide pZNT::lux ; en effet, DH10B porte certaines mutations dont on ignore l'effet sur la réponse lumineuse.

Nous avons également testé une bactérie communément associée au sol, qui à priori, est plus fréquemment exposée aux métaux lourds. Ainsi, la souche DF57 de *Pseudomonas fluorescens* (Kragelund *et al.*, 1997) a été transformée par pZNT::lux. Mais les transformants ainsi obtenus ne produisent pas de lumière, même en présence de concentrations élevées de cadmium, mercure, plomb ou zinc, indiquant que la fusion *zntA*::lux n'a pas été induite. Nous avons donc émis l'hypothèse que le promoteur de *zntA* chez *E. coli* n'est pas reconnu par la machinerie transcriptionnelle de *Pseudomonas fluorescens*. Pourtant, Rossbach *et al.* (2000) ont récemment identifié un gène chez *P. fluorescens* présentant une homologie de 63% avec le gène *zntA* d'*E. coli*. Les auteurs ont montré que l'expression de ce gène est également induite en présence de Cd(II), de Hg(II), de Pb(II) et de Zn(II). Malheureusement, la séquence du promoteur de ce gène n'est pas disponible dans les banques de données et nous ne pouvons pas la comparer à celle du promoteur de *zntA* d'*E. coli*.

Il est également possible que d'autres facteurs intracellulaires ne permettent pas une transcription ou une traduction correcte du plasmide. Grâce à la pression de sélection par les antibiotiques dans le milieu, le maintien des plasmides dans la cellule a été à priori assuré.

Nous avons montré que le milieu de culture a une forte influence sur la réponse, aussi bien en terme de sensibilité aux métaux et d'intensité de luminescence, qu'en terme de rapidité de la réponse. Les trois milieux testés sont très différents au niveau de leur composition : LB est un milieu riche, MN est de l'eau physiologique tamponnée contenant du calcium et du magnésium, et le milieu GGM est un milieu minimum composé de substances qui ne précipitent pas les métaux lourds.

Dans le milieu riche, MG1655/pZNT::lux ne répond qu'à des quantités très importantes de métaux. Pour une application potentielle comme outil d'analyse, ces conditions de test ne sont pas adaptées : la méthode serait trop peu sensible pour la détection de métaux lourds. Nous avons donc émis l'hypothèse que les composantes du milieu diminuent la disponibilité des ions aux bactéries. En effet, l'extrait de levure et la tryptone sont probablement trop chargés en peptides ou autres substances organiques qui peuvent complexer des ions métalliques et les rendre indisponibles. En effet, il est admis que les métaux lourds sont absorbés par les bactéries

principalement sous forme d'ions libres (Giller *et al.*, 1998). Sous d'autres formes chimiques, les métaux sont moins, voire totalement indisponibles pour les organismes.

Pour éviter les réactions entre les métaux et le milieu de culture, nous avons choisi d'utiliser des milieux synthétiques ne contenant aucun composé chélateur.

Dans un premier temps, nous avons testé le milieu minimum MN pour éviter d'une part la précipitation de métaux, et d'autre part le développement bactérien, ce qui permet de garder le nombre de cellules stables au cours de la mesure. Mais, nous avons montré que la réponse de la souche rapporteur est infime dans ces conditions de culture. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette faible induction était due à un manque de nutriments dans le milieu. En effet, le même test effectué dans le milieu MN contenant 10% de LB améliorerait sensiblement la réponse. Malgré tout, ces conditions expérimentales limitaient la sensibilité et la fiabilité du test.

Dans un deuxième temps, nous avons testé le milieu GGM. En effet, ce milieu contient les nutriments essentiels qui permettent aux cellules d'avoir une activité métabolique correcte. Ce milieu représente donc un bon compromis entre un milieu trop riche, comme le LB, et un milieu trop appauvri, comme le MN. Dans le milieu GGM, la réponse de MG1655/pZNT::lux est plus sensible (seuil de détection), plus intense (facteur d'induction) et plus rapide (temps d'incubation). Mais pour une réponse optimale, il est nécessaire de le compléter avec 2% de LB. Pour des raisons inconnues, la souche rapporteur ne répond que lentement et l'émission de lumière est nettement inférieure dans du GGM pur.

Nous avons montré que la réponse de MG1655/pZNT::lux est optimale lorsque les cellules sont en début de phase exponentielle de croissance dans du milieu GGM. Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats est que durant la croissance bactérienne rapide, l'énergie disponible est essentiellement utilisée pour la production des protéines et des acides nucléiques nécessaires à une division cellulaire et un développement rapide. Ce n'est que dans cette phase de croissance que les bactéries sont capables d'exprimer des réponses inductibles à des stress particuliers. En phase stationnaire, alors que la génération d'énergie est réduite, les réponses inductibles sont limitées et *E. coli* développe des résistances permanentes aux conditions adverses de l'environnement (Huisman *et al.*, 1996).

Un autre point a été évoqué par Rattray *et al.* (1990) qui ont pu observer que la luminescence des souches d'*E. coli*, contenant des plasmides avec la cassette *luxCDABE*, varie avec la phase de croissance, contrairement aux organismes qui portent uniquement les gènes *luxAB*. En effet, ces organismes nécessitent un apport externe de dodécyl aldéhyde, afin de garder la concentration stable en substrat. En revanche, la réaction de bioluminescence chez les

organismes portant *luxCDABE* est dépendante de la production d'aldéhyde par *luxCDE* (Blouin *et al.*, 1996) qui dépend du flux d'acides gras et d'aldéhydes aliphatiques vers le système acide gras réductase. En effet, ces composés doivent être dérivés de leur destination normale, la production de lipides, au profit de la réaction de luciférase (Meighen, 1988). Il est donc possible de faire l'hypothèse que les changements métaboliques intervenant au cours des différentes phases de croissance affectent la disponibilité du substrat nécessaire à la bioluminescence, causant ainsi des fluctuations de la bioluminescence (Neilson *et al.*, 1999). Cette hypothèse explique aussi en partie qu'une luminescence satisfaisante n'est obtenue que lorsqu'une source carbonée est additionnée au milieu à tester (voir paragraphe précédent).

La quantité de cellules présente dans le milieu de test influence la réponse. En effet, la luminescence augmente proportionnellement à la quantité de cellules pour des densités optiques inférieures à 0,5. En revanche, à une densité optique supérieure à 0,5, la luminescence de la culture bactérienne baisse. Nous émettons l'hypothèse que cette baisse de luminescence peut être due à la turbidité de la suspension bactérienne. Il est également possible qu'à des densités cellulaires élevées, la concentration en oxygène dans le milieu diminue, provoquant ainsi un affaiblissement de la réaction luminescente, puisqu'elle dépend considérablement de la concentration intracellulaire en oxygène.

Rasmussen *et al.* (1997) ont montré pour un test de bioluminescence avec une fusion *mer::lux* qu'une densité cellulaire élevée limite la sensibilité de l'essai pour des faibles concentrations en mercure. Ils ont émis l'hypothèse que divers composants cellulaires rentrent en compétition avec le régulateur génétique pour lier les métaux lourds, les cations sont donc titrés. Ainsi, avec le nombre des cellules dans la culture décroît la disponibilité des cations pour le régulateur génétique, et la réponse luminescente reste faible. De plus, Ramamoorthy *et al.* (1977) ont observé que les cellules bactériennes peuvent adsorber des métaux lourds sur leur membrane externe, comme sur toute autre matière organique non-vivante. Une densité cellulaire trop élevée diminuerait ainsi la biodisponibilité des métaux. Dans notre cas, une sensibilité accrue aux métaux lourds lors d'une diminution de la densité optique n'a pas été confirmée.

Nous avons pu montrer une diminution du temps de latence en fonction de la densité cellulaire comme précédemment observé chez *Pseudomonas putida*. En effet, par un test de bioluminescence d'une fusion *nah::luxCDABE* chez *P. putida*, Neilson *et al.* (1999) ont mesuré que le délai d'induction diminue de 60 min à 200 min par augmentation de la concentration cellulaire d'une unité logarithmique. Dans notre cas de mesures avec MG1655/pZNT::*lux*, le temps de latence et donc le temps de mesure, diminue avec la concentration cellulaire dans

l'essai. Malgré le gain de temps, nous avons décidé de ne pas dépasser une densité optique de $A_{600}=0,2$, pour limiter la quantité de matière organique dans la culture.

Les variations du pH du milieu de culture ont un grand effet sur la luminescence inductible. La tendance générale est qu'en milieu basique, la réponse est moindre qu'à des pH acides. Deux faits peuvent expliquer ce résultat. D'une part on sait que les métaux lourds sont peu solubles en milieux aqueux à des pH élevés (Greenwood et Earnshaw, 1990) et d'autre part, on suppose que seuls les ions métalliques libres et non-complexés sont disponibles pour la cellule (Checkai *et al.*, 1987). Ainsi, on part du principe qu'un milieu à pH acide augmente la disponibilité des métaux lourds aux organismes (Giller *et al.*, 1998), donc une baisse du pH de notre milieu de test devrait se traduire en une meilleure réception des cations par la souche rapporteur. Nous en déduisons donc que la chute de la luminescence à des pH élevés est en partie due à une baisse de la biodisponibilité des métaux lourds pour MG1655/pZNT::lux. D'autre part, la physiologie bactérienne est affectée par des changements du pH extérieur. Les cellules d'*E. coli* maintiennent leur pH intérieur entre 7,4 et 7,8 pendant la croissance dans des milieux à pH compris entre 5,0 et 9,0 (Zilberstein *et al.*, 1984). En même temps que l'effort du maintien du pH, la bactérie doit entretenir le potentiel membranaire afin que la cellule garde la force protomotrice. L'homéostasie du pH implique un certain nombre de réponses intracellulaires qui ne sont pas entièrement élucidées (Slonczewski et Foster, 1996). Ces réactions de maintien du pH peuvent perturber la physiologie de MG1655/pZNT::lux, ce qui peut affecter aussi la luminescence. La croissance de la culture ne semble pourtant pas affecté dans la gamme de pH utilisée (pH 5,5 – 8,5).

Avec ces données, nous avons développé un protocole expérimental qui permet la détection des métaux lourds cadmium, mercure, plomb et zinc à partir de concentrations respectives de 0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM et 0,3 μM . Avec ce protocole standardisé, nous avons considérablement amélioré la sensibilité de l'essai comparé aux mesures préliminaires. Le test est facile à mettre en œuvre : une préculture est concentrée par centrifugation et la densité optique est ajustée ($A_{600}=10$). Cette culture est ensuite diluée au 1/50 dans du GGM et directement incubée avec l'échantillon à tester. Ensuite, la mesure de luminescence se fait automatiquement à l'aide d'un luminomètre.

Malgré ce protocole simple, force est de constater que la reproductibilité est parfois problématique. En effet, le nombre de facteurs intra- et extracellulaires affectant l'émission de lumière de MG1655/pZNT::lux, à partir du moment où la cellule entre en contact avec les ions

métalliques jusqu'à la réaction de la luciférase elle-même, est important. Le moindre changement de facteurs externes, comme une variation de température ou un délai avant la mise en contact avec les métaux, peuvent modifier les résultats. Des solutions potentielles pour limiter ces variations seront exposés ultérieurement dans le chapitre "Perspectives".

L'essai de bioluminescence basé sur la souche rapporteur MG1655/pZNT::lux qui a été développé dans cette partie du travail sera appliqué à la détection de métaux lourds dans des échantillons naturels dans le chapitre suivant.

III. Applications du biocapteur comme outil d'analyse

Nous avons développé un test de bioluminescence basé sur l'utilisation de la souche rapporteur bioluminescente MG1655/pZNT::lux. Cette souche bactérienne porte une fusion transcriptionnelle *zntA::luxCDABE* et produit ainsi de la lumière en présence de faibles concentrations en métaux cadmium, mercure, plomb et zinc.

Une application directe de ce système est envisageable comme outil d'analyses d'échantillons environnementaux provenant d'origines diverses : des échantillons d'eau, des sols, des sédiments et des lixiviats de sols. Mais, ces échantillons naturels sont généralement composés de mélanges de substances organiques et inorganiques en concentrations variables qui peuvent influencer la disponibilité des métaux pour la bactérie. De plus, il faut prendre en considération la possibilité de la présence de plusieurs métaux à la fois dans l'essai et ses effets sur la réponse de MG1655/pZNT::lux.

Ce chapitre est donc consacré à l'étude de la réponse lumineuse quand MG1655/pZNT::lux est exposée à des échantillons plus complexes. Dans un premier temps, nous avons testé, dans des conditions standardisées, la réponse à un ou plusieurs métaux lourds, et l'influence de la présence de chélateurs des métaux. Dans un deuxième temps, des essais préliminaires ont été effectués afin d'évaluer les performances de ce système pour une application comme essai analytique sur des échantillons environnementaux.

III.1. Induction en présence de plusieurs métaux

Jusqu'à présent, nous avons essentiellement testé la réponse de MG1655/pZNT::lux en présence d'un seul inducteur. Mais, dans un échantillon environnemental potentiellement contaminé par des métaux lourds, il est probable que plusieurs métaux induisant la fusion *zntA::lux* soient présents. La réponse de la souche rapporteur a donc été testée lors d'une exposition avec les métaux inducteurs à 3 concentrations différentes et par couples de métaux en quantité équimolaire (Figure 30).

Comme déjà présenté en figure 29, la luminescence de MG1655/pZNT::lux est induite selon la concentration des métaux dans l'ordre Cd>Pb>Hg>Zn. En figure 30a, on observe qu'à une concentration de 0,1 μ M, le cadmium induit la luminescence au niveau le plus élevé. Quand le cadmium est mélangé à d'autres métaux de façon équimolaire, l'intensité de la

luminescence résultante est légèrement réduite, mais toujours à un niveau élevé. Le plomb induit à 0,1 μM une luminescence d'un facteur 15. En mélange équimolaire avec le mercure et le zinc, ce facteur d'induction semble inférieur, mais cette diminution n'est pas significative. Le plus faible inducteur à cette concentration d'un facteur 3 est le mercure ; en présence de 0,1 μM de zinc, aucune induction significative ne peut être observée. Le zinc et le mercure ensemble provoquent la même réponse que le mercure seul.

La tendance observée en figure 30a est qu'un mélange de métaux n'induit pas d'effet synergique et que MG1655/pZNT::lux répond d'après le métal inducteur le plus fort qui est présent. Ainsi, à 0,1 μM le Cd, étant le plus fort inducteur, "masque" la présence des autres métaux, suivi par le plomb, le mercure respectivement comme deuxième et troisième inducteur.

Cette tendance semble se poursuivre en présence de 1 μM de métaux inducteurs (figure 30b) à l'exception du cadmium, qui à cette concentration s'avère inhibiteur de la luminescence. Quand le cadmium est additionné avec le plomb, l'induction est encore diminuée par rapport au Cd seul. Le mercure et le zinc n'influencent guère la réponse de la souche rapporteur à la présence de Cd. A 1 μM , le plomb est donc le plus fort inducteur avec un facteur d'induction de 40. Combiné avec le mercure et le zinc, la réponse au plomb est légèrement diminuée, mais toujours à un haut niveau d'induction. La luminescence en présence de mercure est induite d'un facteur 20, et la présence de zinc ne semble pas influencer la réponse significativement. En effet, la présence de Zn est cachée lorsqu'un autre métal inducteur est présent à la même concentration.

En général, la réponse de MG1655/pZNT::lux en présence de quantités équimolaires de métaux inducteurs a tendance à suivre l'induction par le plus fort inducteur présent. Cette "affinité" de la souche rapporteur baisse dans l'ordre Cd>Pb>Hg>Zn.

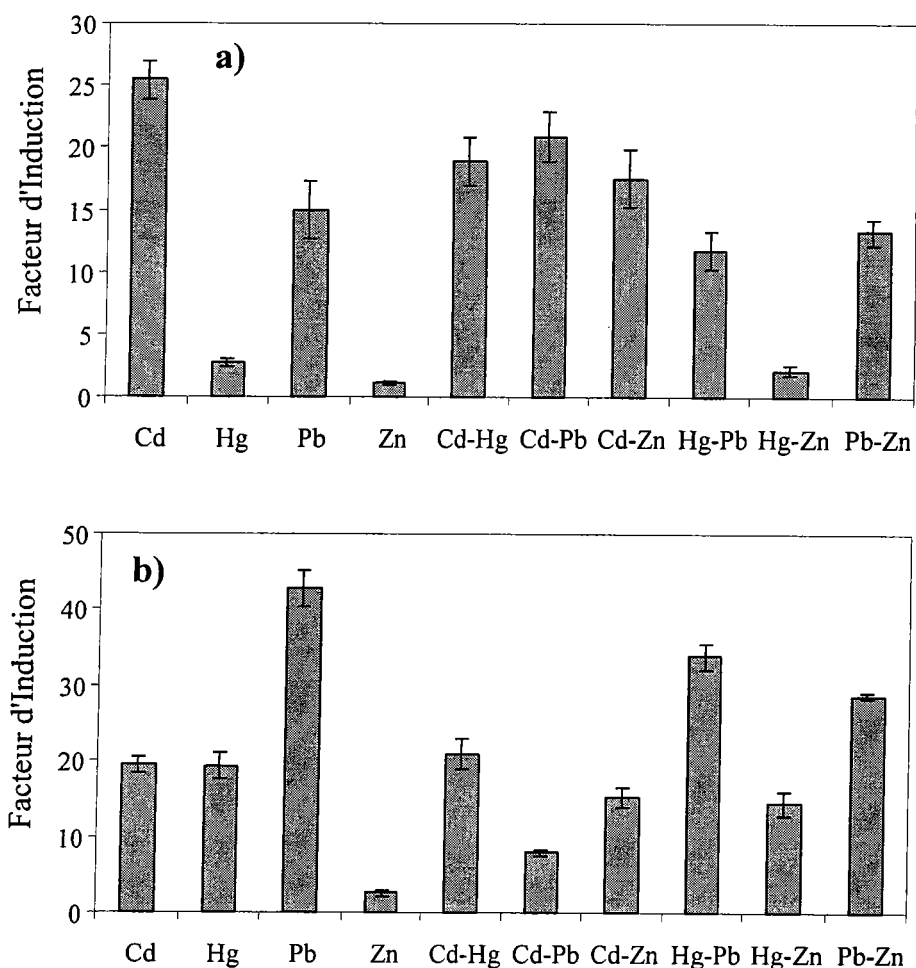


Figure 30 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en présence de CdCl₂, HgCl₂, Pb(NO₃)₂ et ZnSO₄, et des combinaisons de deux composés équimolaires.

La luminescence a été mesurée après 80 minutes d'exposition à a) 0,1 μM et b) 1 μM. Les écart-types ont été calculés à partir de mesures sur une culture effectuées en triplicat.

III.2. L'influence des substances chélateurs

Le terme "biodisponibilité" décrit généralement la facilité relative d'absorption d'un nutriment ou d'un contaminant par un système biologique, et cela peut être quantifié par l'effet que cette substance exerce sur l'organisme (De Haan *et al.*, 1993). A l'aide de notre construction MG1655/pZNT::lux et de l'essai de bioluminescence qui a été développé, il est donc possible de détecter des quantités de métaux lourds qui sont disponibles pour la bactérie.

Pour évaluer l'influence de substances chélateurs et précipitants sur la biodisponibilité des métaux pour MG1655/pZNT::lux, nous avons mesuré la réponse de la souche rapporteur en présence de métaux additionnés de solutions d'EDTA ou de Na₂S. L'EDTA est capable de

former des complexes stables avec un grand nombre de cations similaires aux complexes avec les groupes réactifs des acides fulviques et humiques présents dans l'environnement.

Dans un premier temps, la souche rapporteur a été incubée en présence d'une quantité fixe de métal choisi afin d'induire une luminescence maximale (0,3 μM de Cd, 1 μM de Pb) et des concentrations croissantes d'EDTA et de Na_2S ont été additionnées au mélange. Parallèlement, un témoin exposé à différentes concentrations d'EDTA et de Na_2S mais en absence de métal a été réalisé (figure 31c). Dans tous les cas, nous avons observé une baisse progressive de la luminescence de façon proportionnelle à la quantité d'EDTA et de Na_2S présent dans l'essai. Cependant, cette diminution a été également observée pour le témoin, indiquant que l'EDTA seul inhibe la production de lumière de la souche rapporteur, et ce pour des concentrations excédant 0,1 μM . Le Na_2S produit un effet similaire, mais pour des concentrations beaucoup plus élevées (10 μM). D'après ces données, il était difficile de savoir si la baisse de luminescence observée lorsque la souche rapporteur induite par le métal est exposée à des quantités croissantes d'agent chélateur est due à la chélation du métal, à l'effet inhibiteur d'EDTA et Na_2S , ou à une combinaison des deux phénomènes.

Afin de résoudre ce problème, nous avons décidé d'effectuer un test similaire, mais à des concentrations en ions métalliques Cd(II) et Pb(II) suffisamment élevées (10 μM) et toxiques pour inhiber la luminescence de la souche, souhaitant restaurer cette luminescence par ajout de chélateur. La figure 31 présente les résultats de cette expérience.

En ce qui concerne l'EDTA, on observe que la luminescence augmente en présence de cadmium et de plomb jusqu'au ratio EDTA/métal de 1, ce qui indique une chélation stœchiométrique du métal. A des concentrations plus élevées, pour des ratios 1,5 et 2 respectivement, la luminescence chute au niveau basal. Lorsqu'il est ajouté au milieu réactionnel, Na_2S cause une restauration de la luminescence jusqu'à un rapport stœchiométrique, et au-dessus. En présence de plomb, le ratio Na_2S /métal qui induit l'émission de lumière la plus intense est de 1,5. La réponse de MG1655/pZNT::lux en présence de cadmium se stabilise en présence d'un ratio Na_2S /métal supérieure à 1.

En général, la restauration de la luminescence est atteinte plus rapidement avec l'EDTA par rapport au Na_2S indiquant ainsi que l'EDTA est un chélateur avec une forte affinité aux métaux lourds. Pour le plomb, le sulfure s'avère comme le meilleur chélateur. En effet, la restauration de la luminescence n'est pas aussi forte en présence d'EDTA. L'effet inverse peut

être observé avec le cadmium : l'induction est très intense avec EDTA, mais le Cd n'est pas entièrement indisponible au biocapteur avec Na_2S .

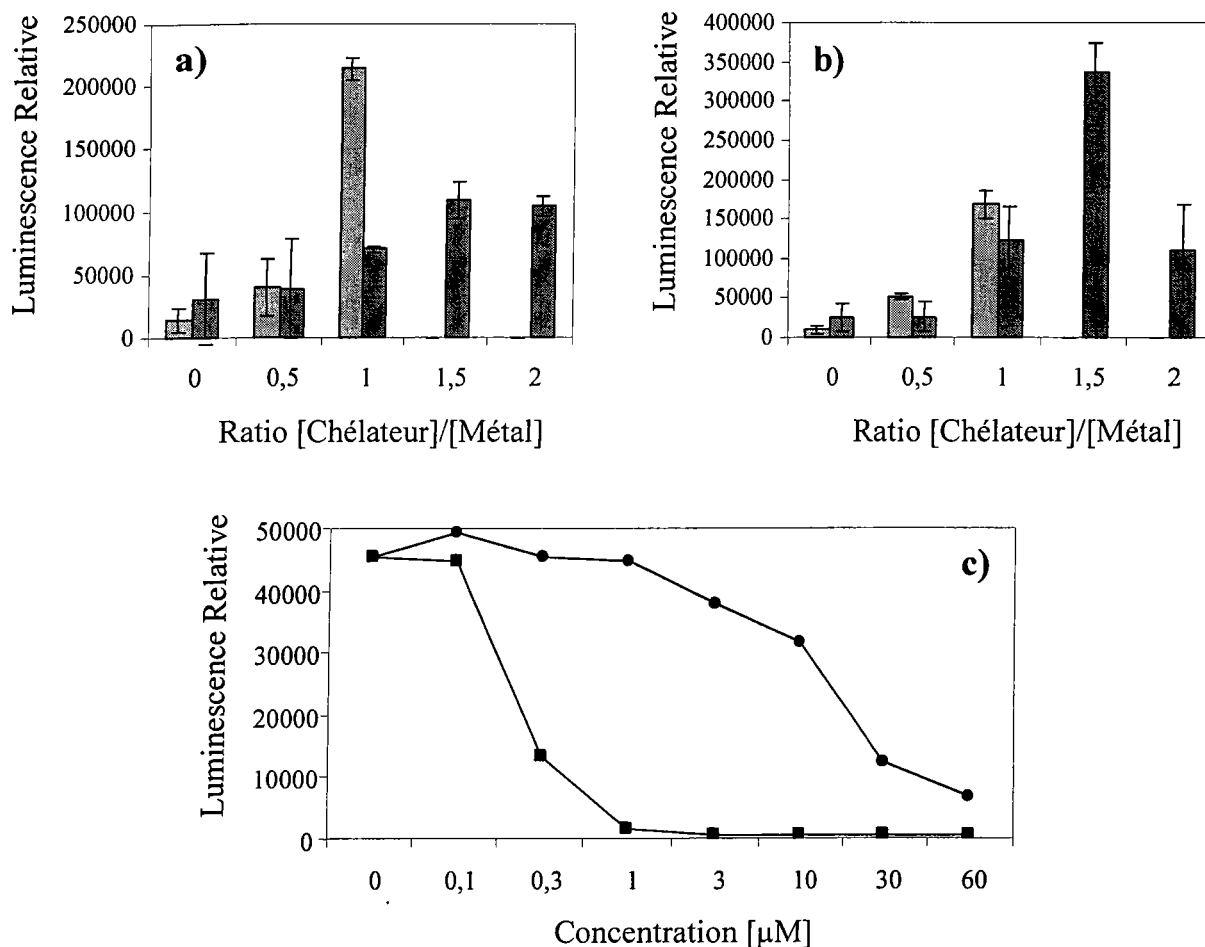


Figure 31 : Réponse de MG1655/pZNT::lux aux métaux lourds en présence des chélateurs EDTA (barres gris foncées) et Na_2S (barres claires).

La souche MG1655/pZNT::lux est incubée avec a) 10 μM de CdCl_2 et b) 10 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et des concentrations en EDTA (barres claires) et Na_2S (barres foncées) pour donner des ratios molaires avec le métal respectif comme indiqués dans les graphiques. e) représente la luminescence avec les chélateurs en l'absence de métaux inducteurs.

Des résultats comparables à ceux présentés en figure 31a+b ont été observés dans des mesures préliminaires en présence de mercure et zinc à une concentration de 100 μM . L'EDTA restaure la luminescence jusqu'au ratio de 1, et au-delà, le surplus d'EDTA inhibe la luminescence. En présence Na_2S la luminescence augmente jusqu'au ratio $\text{Na}_2\text{S}/\text{métal}$ de 2.

III.3. Application à des échantillons environnementaux

Dans cette partie, avons testé les performances du biocapteur en vue de l'analyse du contenu en métaux lourds dans des sols naturels. Un sol limono-argileux non pollué a été utilisé afin d'y additionner des solutions de CdCl_2 , HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et ZnSO_4 pour atteindre des concentrations respectives de $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ et $10 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de sol sec. D'une part, des échantillons de ces sols ont directement été mis en contact avec une culture de MG1655/pZNT::lux selon le protocole standardisé établi précédemment. Et d'autre part, les sols ont été lixiviés et ces extraits aqueux ont été analysés également par la souche rapporteur. Dans les conditions de test utilisées, on obtient des concentrations finales théoriques indiquées dans le tableau ci-dessous.

Teneur du sol en métal	$0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	$0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	$0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	$1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
Concentration dans le mélange réactionnel en présence de sol	$0,1 \mu\text{M}$	$1 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$
Concentration dans le mélange réactionnel en présence de lixiviat	$0,01 \mu\text{M}$	$0,1 \mu\text{M}$	$1 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$

Tableau 11 : Teneur maximum possible en métaux lourds dans le milieu réactionnel.

Pour l'essai de contact avec le sol, 20 mg de sol ont été suspendus avec 200 μl de culture, et pour l'essai avec les extraits aqueux, 20 μl du lixiviat ont été mélangés avec 180 μl de culture.

Les valeurs sont calculées sur la base des quantités de métaux lourds qui ont été ajoutées dans les sols.

On peut constater qu'avec MG1655/pZNT::lux, il est possible de détecter la présence de métaux lourds quand cette souche est directement mise en contact avec les sols artificiellement contaminés (figure 32). En effet, la présence de cadmium est mesurable à partir d'une teneur de l'ordre de $0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, comparée à l'échantillon du même sol non-contaminé. L'induction de la luminescence augmente considérablement avec la teneur en cadmium jusqu'à $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$; à $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de CdCl_2 dans le sol, la luminescence baisse en raison de la toxicité du métal.

La présence de mercure et de plomb dans le sol devient détectable à partir d'une concentration de $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ dans le sol, et à $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, l'induction est maximale pour ces deux métaux. Il faut noter qu'à ces deux concentrations, la réponse au mercure est plus intense par rapport au plomb. Ce résultat est inattendu, car MG1655/pZNT::lux répond dans des conditions standardisées, en utilisant des solutions de métaux, plus fortement et plus

sensiblement à la présence de plomb. Il y a donc une meilleure disponibilité du mercure dans le sol, et le plomb est devenu inerte pour la bactérie. A une concentration de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, le zinc peut être détecté par le biocapteur ; à de plus faibles concentrations, l'induction de la luminescence est infime, et donc insignifiante.

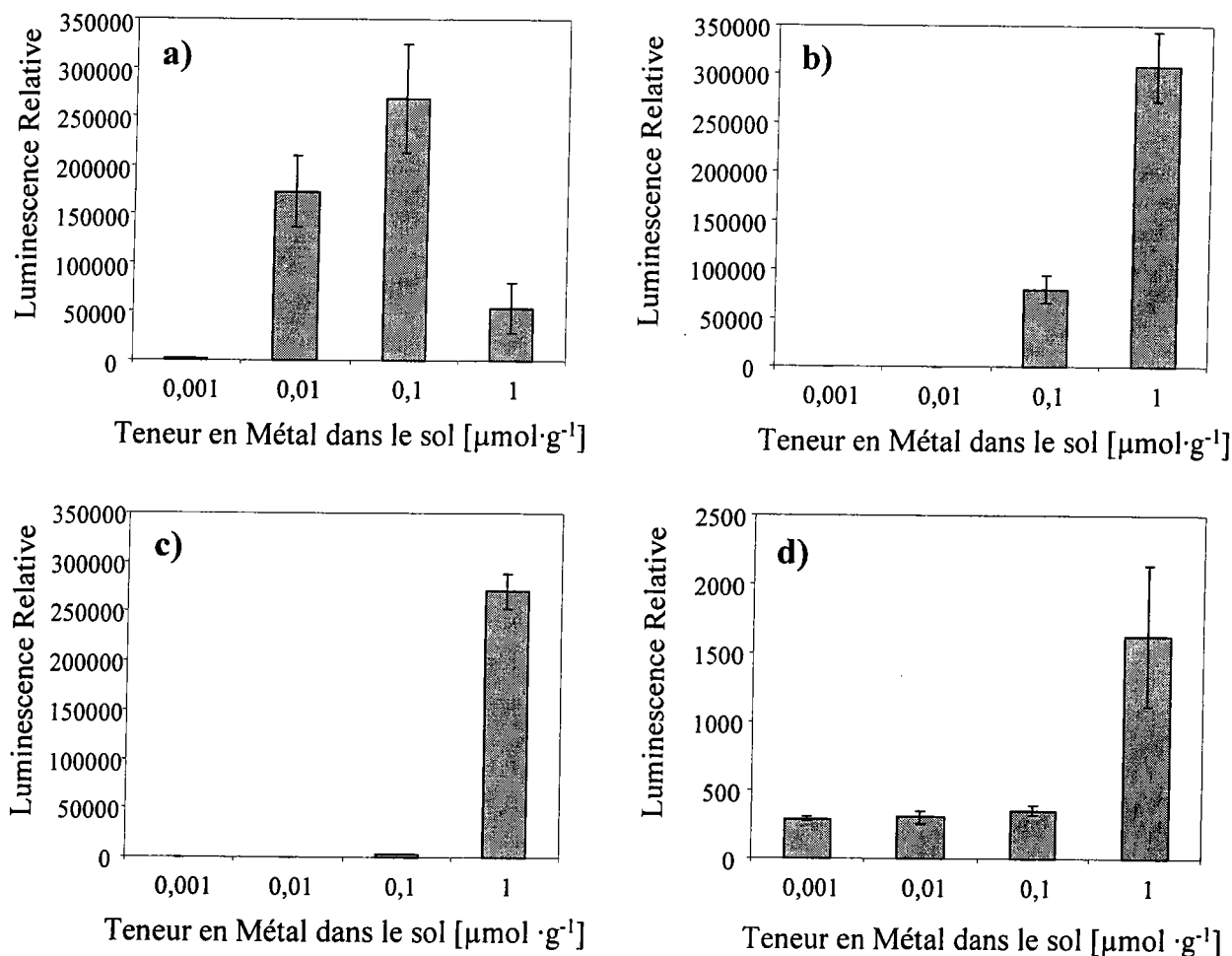


Figure 32 : Réponse de MG1655/pZNT::lux en présence du sol standard artificiellement contaminé.

a) CdCl₂, b) HgCl₂, c) Pb(NO₃)₂ et d) ZnSO₄ à 4 concentrations différentes. 200 μl de culture sont incubés avec 20 mg de sol pendant 80 minutes. Le standard, sol sans ajout de métaux, se situe à 259 ± 19 unités de luminescence relative.

De manière générale, l'application des métaux sur la matrice complexe, telle que le sol utilisé, a rendu les métaux moins disponibles à la bactérie. Les concentrations de métaux qui sont détectables dans les sols sont nettement supérieures aux concentrations qu'on peut analyser dans des solutions standard. Par exemple, le seuil de détection du zinc dans la culture avec l'échantillon de sol en suspension est 100 fois plus élevé qu'en milieu liquide standardisé.

Il faut noter également que la luminescence de MG1655/pZNT::lux est maximale à la concentration théorique de 100 μM (10 μM pour cadmium), ce qui correspond en solution, à des teneurs supérieures aux doses létales pour la bactérie. Ainsi, la sensibilité de détection des métaux inducteurs est inférieure lors d'une incubation des métaux avec le sol.

Comme les contaminants présents dans un sol sont souvent immobilisés par des liaisons avec des composantes du sol, on utilise des procédures d'extraction afin de récupérer la partie mobile de ces substances, car on considère cette partie comme disponible aux organismes et donc potentiellement toxique. L'approche de lixiviation des sols est notamment utilisée pour analyser la quantité des métaux lourds biodisponibles, parce que la quantité de métaux dissous dans le lixiviat peut être corrélée avec la disponibilité des éléments pour les organismes (Rauret, 1998).

Dans notre cas, il était intéressant de déterminer quelle était la quantité en métaux lourds détectable par la souche rapporteur des sols artificiellement contaminés, récupérée par une procédure de lixiviation. Les sols du test précédent ont donc été lixiviés avec un rapport sol/eau de 1/10 (Norme AFNOR X31-210), ce qui conduit à une dilution par un facteur 10 comparé à l'essai de contact. Ces lixiviats ont ensuite été incubés avec une culture de MG1655/pZNT::lux.

Le biocapteur répondait à la présence des lixiviats par une très faible augmentation de la luminescence par rapport au témoin (figure 33). Cette augmentation n'est pas significative pour les lixiviats des sols contaminés au mercure, au plomb ou au zinc ; on observe une très légère induction en fonction de la concentration de métal ajoutée, mais une véritable détection ne peut être constatée que quand la luminescence est au moins doublée. Les intervalles d'erreur sont trop importants pour permettre une interprétation, même à une pollution théorique de 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de sol. Au contraire, la présence du cadmium est détectable à cette concentration et l'induction est bien visible. Pour des concentrations inférieures de Cd(II), aucune détection n'est possible.

(

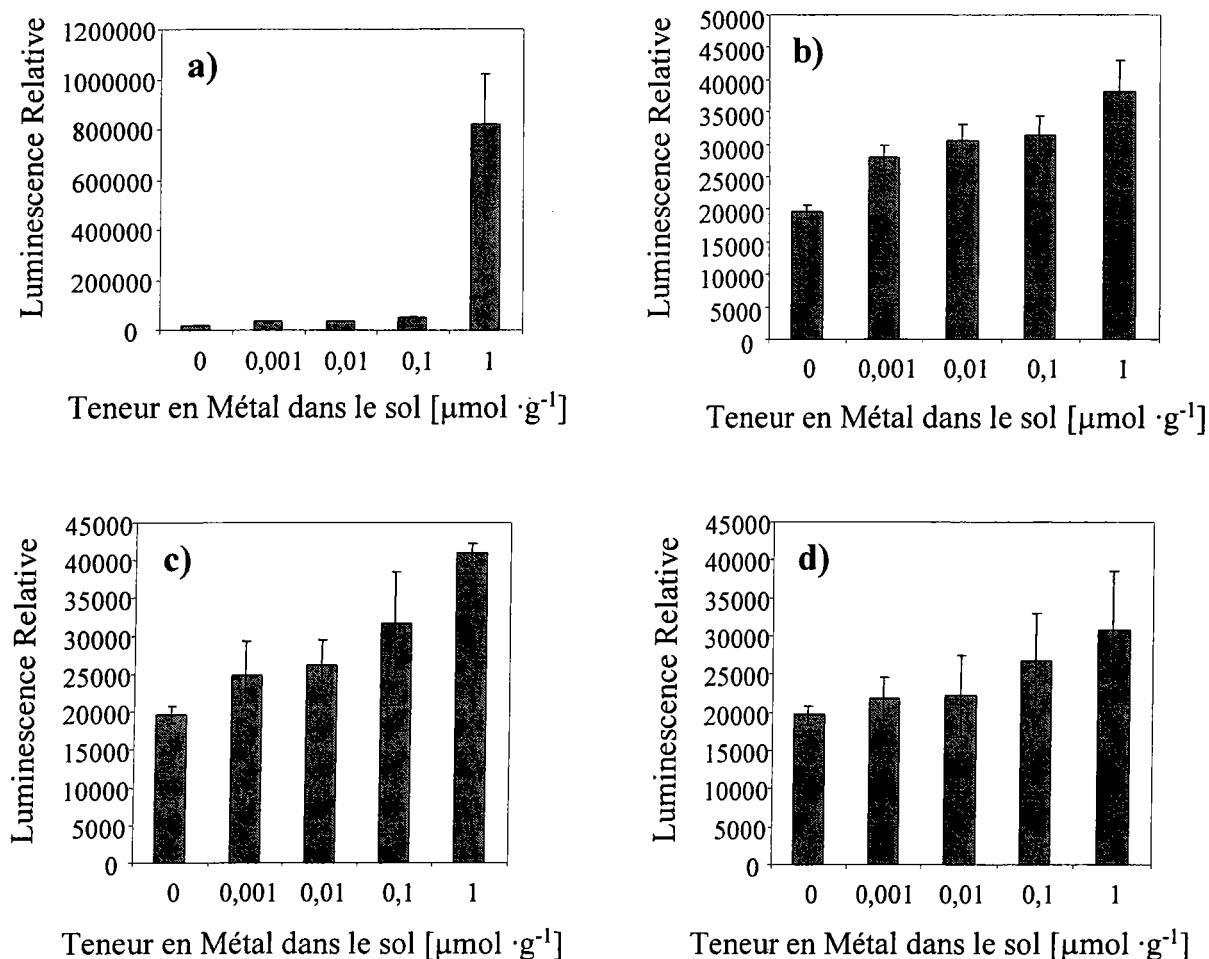


Figure 33 : Réponse de *MG1655/pZNT::lux* en présence lixiviats des sols de figure 32.

Les contaminants sont a) CdCl_2 , b) HgCl_2 , c) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et d) ZnSO_4 et le temps d'incubation était de 80 minutes. Les valeurs sont la moyenne de 2 mesures indépendantes effectuées en double, les barres d'erreur représentent l'écart-type par rapport à la moyenne.

Le niveau basal de la luminescence lors d'un contact direct de *MG1655/pZNT::lux* avec les sols est à 260 unités, valeur nettement inférieure à celle observée en présence de lixiviats où on mesure 20000 unités de luminescence relatives. Il existe donc la possibilité d'un effet d'absorption de la lumière émise par les particules du sol en suspension. De même, l'induction maximale de lumière en valeur absolue est également inférieure pendant l'essai de contact. On peut aussi envisager la possibilité que la physiologie cellulaire était affectée par le contact avec le sol, dont certains composants peuvent être toxique pour la bactérie.

Nous avons effectué des mesures de bioluminescence sur d'autres types de sols contaminés nommés S1 et S3. S1 est un sol artificiellement contaminé par des métaux lourds, et S3 provient d'un site industriel pollué par des nombreux contaminants, dont des métaux

lourds et des composés organiques. Leur teneur en métaux inducteurs est donnée dans le tableau ci-dessous.

	Cd	Hg	Pb	Zn
Sol S1	0,18 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	-	3,86 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	30,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
Sol S3	0,26 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	0,011 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	5,79 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	34,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$

Tableau 12: Teneur des sols S1 et S3 en Cd, Hg, Pb et Zn (cf. annexes).

Comme pour la première série de sols artificiellement contaminés, nous avons fait un test en contact direct et un test après lixiviation des sols S1 et S3. A défaut de sol S1 et S3 non-contaminés, on a utilisé le sol témoin de la mesure précédente (figure 32), de composition différente de celle des sols S1 et S3. En figure 34, on observe une induction de la luminescence en présence des deux sols et des lixiviats correspondants. La charge en métaux lourds est donc assez importante pour être détectée même après le processus de lixiviation.

La présence du sol S3 induit une émission de lumière qui est 700 fois plus élevée que le niveau basal, mais le lixiviat de S3 n'induit que 10 fois. En présence de S1 par contre, MG1655/pZNT::lux répond plus fortement au lixiviat (facteur d'induction de 40) que dans l'essai de contact avec une induction d'un facteur 10. Les 10% de S1 présents dans la culture de MG1655/pZNT::lux entraînent probablement une quantité de métaux lourds trop élevée pour une bonne réponse. Quand la quantité de sol dans le test est divisée par 2, la luminescence est plus que doublée, ce qui indique que la réponse de la souche rapporteur est effectivement inhibée par des concentrations toxiques en métaux biodisponibles. La présence du sol S3 à 5% ou 10% dans la culture ne change pas significativement la quantité de lumière émise. Apparemment, la quantité de métaux lourds présente dans l'échantillon mène à une saturation de la réponse. Il est aussi probable que la matière en suspension influence la détection de la luminescence.

Même si la charge en métaux est comparable dans les deux sols, la réponse de MG1655/pZNT::lux varie considérablement en présence de S1 et S3. L'influence du type de sol est ainsi un facteur qui peut changer la biodisponibilité des métaux à la bactérie dans le sol.

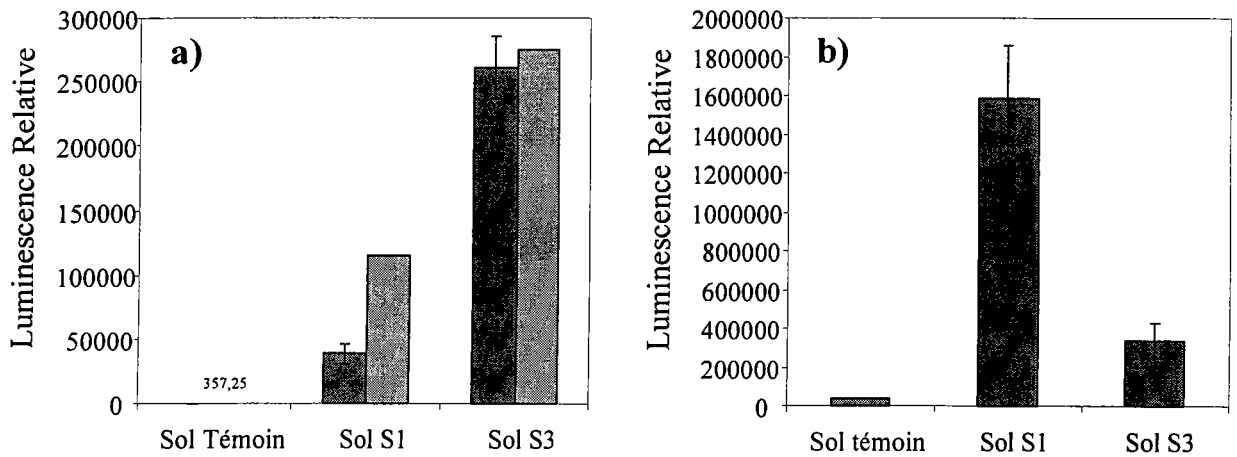


Figure 34 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en présence des sols S1 et S3, et de leur lixiviat.

Les essais représentent la moyenne de 2 tests indépendants effectués en double.

a) Essai de contact : 20 mg (barres foncées) ou 10 mg (barres claires) de sol sont incubés avec 200 µl de milieu réactionnel pendant 80 minutes. L'essai en présence de 10 mg de sol n'a pas été répété, d'où l'absence des barres d'erreur.

b) Essai d'extrait : 20 µl de lixiviat sont incubés pendant 80 minutes avec 180 µl de culture.

III.4. Discussion

Nous avons ainsi montré qu'avec MG1655/pZNT::lux, la détection des métaux cadmium, mercure, plomb et zinc est possible dans des échantillons environnementaux, même dans des matrices complexes comme des sols. Un simple essai de bioluminescence permet de mettre en évidence une pollution par ces métaux et leur biodisponibilité pour la souche rapporteur.

Cependant, le bioessai sur base de MG1655/pZNT::lux ne permet pas de distinguer la présence d'un ou plusieurs métaux inducteurs dans un échantillon. En effet, nous n'avons pas constaté d'effet synergique des 4 métaux inducteurs lorsqu'ils sont mélangés deux à deux en quantité équimolaire. Ainsi, les cations sont en compétition pour l'induction de la luminescence. La réponse de MG1655/pZNT::lux est déterminée par le niveau du meilleur inducteur présent. En effet, les ions métalliques sont des inducteurs plus ou moins forts, et leur capacité d'induction baisse dans l'ordre Cd>Pb>Hg>Zn. Ainsi, à des concentrations équimolaires, la présence de cadmium empêche la réponse à des autres ions présents et la réponse du zinc est toujours cachée par les autres inducteurs. Cet ordre d'affinité des métaux

inducteurs correspond à l'ordre des seuils d'induction de la plus faible à la plus grande concentration (voir figure 29).

Ces résultats peuvent être expliqués par les mécanismes régulant l'expression de *zntA*. Au niveau moléculaire, c'est la protéine ZntR qui intervient dans la régulation de l'expression de *zntA* et plus précisément, c'est le complexe métal-ZntR qui permet l'initiation de la transcription. Outten *et al.* (1999) ont rapporté que le zinc est inducteur principal, car ZntR a une grande affinité pour le Zn ; Hg et Cd n'induisent que faiblement, mais à des concentrations moins élevées. Dans nos conditions d'essai, par contre, la réponse est notamment induite par Cd, Pb et Hg ; le Zn n'induit qu'à des fortes concentrations. Jusqu'à présent, les concentrations cytosoliques des métaux induisant la transcription de *zntA* sont inconnues, elles dépendent de la formation du complexe métal-ZntR et donc de l'affinité de ZntR pour les différents cations (Brocklehurst *et al.*, 1999).

De plus, comme tous les homologues de la famille des activateurs transcriptionnels de MerR, ZntR porte un domaine C-terminal très conservé, qui reconnaît spécifiquement les cations inducteurs (Peterson et Moller, 2000). Par exemple, le site de fixation de Hg(II) dans MerR montre une grande préférence au mercure par rapport au cadmium ou au zinc (Summers, 1992), mais il a été possible de créer par mutagenèse, des mutants de MerR avec une grande affinité pour Cd(II) et Zn(II) (Caguiat *et al.*, 1999). Il est donc envisageable de modifier la séquence d'acides aminés dans ZntR afin d'obtenir des mutants ayant une affinité changée pour l'un ou l'autre métal inducteur. En s'inspirant des motifs des domaines dans différentes protéines régulatrices de la même famille, comme par exemple CueR (ou CopR) qui ne répond pas au zinc (Outten *et al.*, 2000 ; Peterson et Moller, 2000), ou PTMR qui répond sélectivement au zinc (Noll *et al.*, 1998), une série de mutants, dont chacun est spécifique à un métal particulier, pourrait ainsi être créée.

Une approche plus simple pour obtenir une analyse de métaux lourds sélective est la création d'un ensemble de tests de plusieurs biocapteurs basés sur d'autres fusions avec les gènes rapporteurs *luxCDABE* déjà existants. La fusion *mer::lux* par exemple qui est très spécifique à la présence de composés de mercure et qui a déjà été testée sur son applicabilité (Rasmussen *et al.*, 1997 et 2000 ; Selifonova *et al.*, 1993) peut être utilisée pour mettre en évidence la présence de Hg dans l'échantillon à tester. De même, une souche rapporteur avec une fusion *cadA::lux* (Corbisier *et al.*, 1993) ou une fusion *cadC::luc* (Tauriainen *et al.*, 1998 ; Tauriainen *et al.*, 2000) pour la détection de cadmium et de plomb ou une fusion *pbrA::lux* (Corbisier *et al.*, 1999) pour la détection de plomb peuvent être exploitées afin d'obtenir des informations complémentaires sur la présence de ces métaux. Cette liste est encore extensible

par la création de nouvelles fusions avec des gènes de la famille des ATPase de type P. En utilisant une telle collection de biocapteurs sur un échantillon, les réponses de chacun peuvent être analysées afin d'obtenir des informations complètes sur le contenu en métaux lourds dans l'échantillon.

Une telle batterie de tests a déjà été mise en pratique pour des composés organiques. Sur la base d'une série de fusions entre différents gènes de stress et les gènes *lux*, il est possible de faire une prévision sur la présence de certaines classes de composés dans un échantillon (Belkin *et al.*, 1997 ; Ben-Israel *et al.*, 1998). Concernant les composés inorganiques, l'analyse avec une collection de biocapteurs devrait être d'autant plus précise, car la réponse des gènes de résistance aux métaux fusionnés avec *luxCDABE* est plus spécifique que la réponse des gènes de stress comme ceux du choc thermique.

Par une série de tests de bioluminescence avec des fortes concentrations en métaux et les agents chélateurs EDTA et précipitants Na_2S , nous avons obtenu une indication de l'effet de la biodisponibilité d'un métal sur MG1655/pZNT::*lux*. Les concentrations des métaux dans le test est tellement élevée que leur présence inhibe le processus de bioluminescence de MG1655/pZNT::*lux*. Par l'ajout de EDTA et Na_2S , la concentration en métal qui est disponible à la souche rapporteur diminue, de sorte que l'émission de lumière réaugmente. La concentration totale en métaux lourds dans le test reste inchangée, mais la mobilité de l'ion et donc sa disponibilité est modifiée. On en déduit qu'à l'aide de la souche rapporteur MG1655/pZNT::*lux*, seules des quantités biodisponibles en métaux sont détectables, contrairement à la charge totale qui est analysée par les méthodes classiques.

De plus, nous avons remarqué que seuls l'EDTA et le Na_2S en présence de MG1655/pZNT::*lux* ont des effets inhibiteurs sur la luminescence. Cet effet est probablement dû à la chélation ou précipitation de substances indispensables pour le processus de bioluminescence ou à un effet de perméabilité et de métabolisme de l'organisme (Campbell *et al.*, 2000).

EDTA porte 6 groupes réactifs (4 carboxyle et 2 aminés) grâce auxquels ce composé est capable de former des complexes non-chargés et stables avec la plupart des cations métalliques (Falbe et Regitz, 1995). Ce composé a été utilisé ici pour simuler l'effet des acides fulviques ou humiques dans des échantillons naturels. Ces acides se forment par la dégradation de matière organique dans des sols ou sédiments et portent aussi des groupes réactifs comme l'EDTA qui leur permet de complexer un grand nombre de métaux. Dans un échantillon

naturel comme le sol, la quantité de ces substances et donc la capacité de chélation varie avec la teneur en matière organique (Filella et Town, 2000).

Un deuxième processus d'immobilisation des ions métalliques est de les rendre insolubles. Nous avons choisi une précipitation avec du sulfure, qui a une grande affinité pour les métaux lourds et avec lesquels il forme des composés peu solubles dans l'eau. Ce processus de précipitation a lieu dans l'environnement sous influence des facteurs abiotiques et biotiques, comme l'activité de bactéries réductrices de sulfates (White *et al.*, 1997).

La forme exacte et la voie par laquelle les différents ions sont absorbés par *E. coli* sont mal connues, mais on part du principe que l'ion libre est la forme la mieux disponible pour les microorganismes (Checkey *et al.*, 1987). On a observé que la biodisponibilité des métaux pour MG1655/pZNT::lux baisse de façon considérable en présence des chélateurs, mais on ignore pourquoi, dans notre test, le plomb en présence de Na₂S et le cadmium avec EDTA serait moins disponible que les complexes inverses (Cd-Na₂S et Pb-EDTA).

Escherichia coli dispose de plusieurs voies d'absorption de métaux dont la plus importante est le transport actif par des pompes membranaires. Le zinc, comme élément trace essentiel dispose d'un système d'importation à grande affinité ZnuABC (Patzner et Hantke, 1998) et un deuxième système d'affinité inférieure PitA (Beard *et al.*, 2000). Les métaux non-essentiels et donc toxiques, tels que le cadmium, le mercure et le plomb, ne disposent pas de système de transport spécifique, ils entrent dans la cellule par diffusion, ou par défaut avec des systèmes de transport de cations divalents moins spécifiques (Bruins *et al.*, 2000). Ainsi, les voies de résorption des métaux lourds par *E. coli* sont diverses et difficiles à suivre pour les différentes formes chimiques des métaux en solution aqueuse.

En plus des chélateurs organiques et des agents de précipitation, la biodisponibilité des métaux lourds est influencée par le pH, comme déjà présenté, et par la salinité de l'échantillon à tester (Tauriainen *et al.*, 2000). Ainsi, on pouvait constater dans la plupart des cas une meilleure disponibilité dans les échantillons présentant une salinité élevée comme de l'eau saumâtre. La présence des chlorures, par exemple, mène à une meilleure désorption de cadmium du sol, ce qui résulte en une meilleure disponibilité de ce métal pour les organismes (Giller *et al.*, 1998). D'autre part, Barkay *et al.* (1997) ont montré que, dans le cas du mercure, lors de la présence de concentrations élevées en chlorures, la biodisponibilité baisse consécutivement à la formation d'un complexe d'une espèce ionique différente [HgCl₄]²⁻ au lieu de Hg²⁺.

Dans un échantillon naturel, la biodisponibilité des métaux lourds est donc altérée par une multitude de facteurs, comme la teneur en matière organique, les substances qui

précipitent les métaux, le pH et la salinité, pour n'en citer que les plus importants. Mais chaque métal a ses propres caractéristiques chimiques qui lui permettent d'entrer dans la cellule par une voie particulière afin d'y développer ses activités. Ainsi, une prévision de la toxicité basée sur la connaissance de la teneur totale en métaux lourds surestime en générale la toxicité exacte dans un milieu particulier, mais à l'aide de l'essai de bioluminescence avec MG1655/pZNT::lux une estimation de la concentration biodisponible en Cd, Hg, Pb et Zn est possible.

Afin d'effectuer des tests préliminaires d'applicabilité de la souche rapporteur pour évaluer la biodisponibilité des métaux lourds dans un sol, nous avons chargé un sol naturel non-pollué avec des solutions aqueuses de CdCl_2 , HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ et ZnSO_4 à différentes concentrations. Ainsi, on peut observer la quantité du métal qui est immobilisée par les composantes du sol. Par application directe du biocapteur sur le sol artificiellement contaminé, nous avons pu détecter les 4 métaux à des faibles concentrations dans le sol. Les seuils de détection sont de l'ordre du $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de sol pour cadmium, du $100 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ pour mercure et plomb, et le zinc induit au $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. La réponse du biocapteur augmente toujours de façon dose-dépendante, ainsi, en application directe avec un échantillon solide, l'approche de la mesure reste semi-quantitative.

Dans l'échantillon d'essai qui se compose de 10% de sol, on calcule pourtant une quantité totale théorique en métaux, qui, dans l'essai standard en milieu GGM, s'avère inhibiteur pour la luminescence de MG1655/pZNT::lux. Ce résultat suggère que la souche rapporteur ne répond pas à des concentrations totales présentes dans l'échantillon, mais seulement à la partie biodisponible. Cet essai de contact révèle également, que les métaux sont en grande partie immobilisés dans le sol et non disponibles pour le biocapteur. L'immobilisation des différents métaux se réalise en différentes proportions : selon l'essai de bioluminescence, le plomb dans le sol induit à des plus fortes concentrations que le mercure, qui lui induit à des concentrations plus élevées dans le milieu GGM liquide dans des conditions standardisées. Nous en déduisons donc que le plomb est moins disponible que le mercure dans la matrice du sol utilisé.

En général, le test de bioluminescence basé sur la réponse de MG1655/pZNT::lux est un bon moyen pour évaluer le contenu de métaux lourds biodisponibles dans les sols. Une évaluation de la pollution d'un sol ne mène ainsi pas à une surestimation du risque provenant d'un sol particulier. Les procédures de l'estimation des risques d'une pollution du sol

s'appuient souvent sur l'extraction à l'eau et l'analyse de ce lixiviat (Rauret, 1998). Cette méthode fréquemment utilisée pour modéliser la mobilité et donc la disponibilité de métaux dans des sols et sédiments, ne correspond pas toujours à ce qui est réellement disponible aux organismes. Cette observation qui a été faite par Rönnpagel *et al.* (1995), pouvait être confirmée par un essai de bioluminescence avec MG1655/pZNT::lux après lixiviation des sols déjà testés par essai de contact.

En effet, la réponse du biocapteur en présence des lixiviats indiquait une très faible teneur en métaux. Par exemple, on obtenait une réponse de MG1655/pZNT::lux avec un lixiviat d'un sol contaminé à partir de $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de CdCl_2 , tandis que par essai de contact, la détection de cadmium était possible à partir d'une teneur de $0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Compte tenu d'un facteur de dilution de 10 par rapport à l'essai de contact, le lixiviat n'induit qu'à une contamination qui est 100 fois plus élevée. Ainsi, par lixiviation des sols avec de l'eau, on sous-estime la quantité de métaux lourds et donc le risque provenant du sol.

Ce procédé d'extraction ne garantit donc pas une bonne évaluation de la quantité biodisponible en métaux lourds dans le sol. *E. coli* MG1655/pZNT::lux, qui n'est pourtant pas une bactérie du sol, est capable d'absorber plus de métaux lourds du sol que par lixiviation à l'eau. Ainsi, l'essai de contact serait dans notre cas une meilleure approche pour évaluer la quantité de métaux lourds dans le sol artificiellement contaminé. L'utilisation d'un biocapteur bactérien comme le notre, sert généralement de bonne approximation du potentiel de contamination métallique dans le sol (Corbisier, 1997). Il faut noter que les résultats d'un seul essai biologique ne donnent pas une image complète de l'état de l'environnement, car d'autres organismes ont des moyens plus adaptés pour résorber des contaminants. Ainsi, pour évaluer complètement la biodisponibilité d'un ou plusieurs polluants, il faudrait utiliser une batterie d'essais biologiques comme proposé récemment par Bierkens *et al.* (1998).

Cette problématique de sous-estimation a déjà été discutée lors d'un test de bioluminescence avec une fusion *mer::lux* pour détecter du mercure dans des lixiviats des sols (Rasmussen *et al.*, 2000). Après lixiviation, les auteurs ont rencontré encore des variations de la biodisponibilité du mercure pour la souche rapporteur selon le choix du traitement du lixiviat par filtration, ultrafiltration ou centrifugation. Ainsi, le lixiviat doit également être considéré comme une matrice complexe.

L'essai de contact avec des biocapteurs bactériens luminescents et des échantillons environnementaux solides a déjà été entrepris avec succès pour évaluer la toxicité de métaux lourds dans un sol (Palmer *et al.*, 1998). La quantification des contaminants inorganiques dans

des sols à l'aide d'un biocapteur s'avérait pourtant difficile (Hay *et al.*, 2000). La corrélation de la luminescence avec la quantité du contaminant dans l'échantillon étant limitée, notamment à cause de la complexité de la matrice et la réponse qui n'est pas spécifique. L'influence de l'absorption de la lumière par la matière en suspension était négligeable.

Nous avons rencontré la problématique de la quantification des métaux lourds dans un échantillon solide en testant les sols S1 et S3. Ces sols contiennent une charge en métaux inducteurs comparable, mais la réponse de MG1655/pZNT::*lux* à la présence des deux sols est variable. Ainsi, la matrice est un élément qui influence considérablement la biodisponibilité du métal. Certaines caractéristiques des sols jouent un rôle particulier, comme la composition générale, la matière organique comme chélateur, le contenu en argile comme adsorbant, le pH, la salinité et le potentiel redox, qui influent la solubilité des cations (Filella et Town, 2000 ; Giller *et al.*, 1998 ; Marosits *et al.*, 2000). Tous ces facteurs ensemble rendent une quantification exacte de la teneur en métaux lourds dans une matrice complexe difficile. Notre biocapteur répond à plusieurs métaux lourds, qui ne sont pas distinguables par la réponse. Mais ces métaux sont considérés comme les plus problématiques dans l'environnement et on parvient à les détecter à des très faibles concentrations.

Il faut également tenir compte du fait que la réponse de MG1655/pZNT::*lux* varie avec les conditions de l'essai (voir chapitre précédent). Nous avons essayé d'éliminer un maximum d'influences sur la bactérie en n'ajoutant que 10% d'échantillon sur 90% de culture.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. Conclusions

Les objectifs de cette thèse étaient, d'une part la recherche et l'identification des gènes chez *E. coli* inductibles par le mercure, et d'autre part la conception d'un biocapteur bactérien basé sur une fusion génétique avec les gènes *lux* pour détecter des métaux lourds.

I.1. Identification de *zntA*

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la technique de fusions transcriptionnelles pour détecter des réponses génétiquement programmées au mercure. Une banque de fusions chez *E. coli* a été créée à l'aide du phage Mud11ac, ce qui a permis d'identifier un gène répondant à la présence de mercure, à savoir le gène *zntA* qui code pour une ATPase de type P exportatrice de métaux lourds (Beard *et al.*, 1997).

Rensing *et al.* (1997 et 1998) ont montré que ZntA transporte le cadmium, le plomb et le zinc vers l'extérieur de la cellule et augmente ainsi la résistance d'*E. coli* envers ces métaux. Par détermination de la CMI, nous avons confirmé qu'un mutant de *zntA* était moins résistant à la présence de ces métaux, tandis que *zntA* n'influence pas la résistance au mercure. Nous avons montré sur la base d'une fusion *zntA::lacZ* que l'expression de *zntA* est induite par le Cd(II), le Hg(II), le Pb(II) et le Zn(II), laissant présumer que le mercure est un inducteur gratuit (Brocklehurst *et al.*, 1999).

La régulation transcriptionnelle est sous le contrôle de la protéine ZntR, qui se fixe sur la séquence promotrice du gène *zntA*, empêchant ainsi sa transcription. Lorsque ZntR est exposée aux métaux inducteurs, elle fixe ces métaux, ce qui induit un changement allostérique de sorte que l'ARN Polymérase puisse transcrire le gène *zntA* (Outten *et al.*, 1999). Nous nous sommes servi de cette régulation pour créer un biocapteur bactérien basé sur une fusion génétique *zntA::lux*.

I.2. Elaboration d'un biocapteur bactérien aux métaux lourds

La séquence promotrice de *zntA* a été amplifiée par PCR et clonée dans un vecteur plasmidique portant les gènes rapporteurs *luxCDABE* codant la luciférase bactérienne de

Vibrio fischeri, ainsi qu'un aldéhyde servant de substrat. L'expression des gènes *lux* est ainsi placée sous le contrôle transcriptionnel de *zntA*. La souche *E. coli* MG1655 a été transformée avec ce plasmide rapporteur (pZNT::*lux*), ce qui se traduit en une émission de lumière lorsque la bactérie est exposée aux métaux lourds.

Ainsi, l'élément biologique du capteur a été conçu. Celui-ci consiste en une cellule vivante portant la fusion *zntA::luxCDABE* sur plasmide et cette cellule rapporteur a été utilisée pour développer un essai de bioluminescence permettant la détection des métaux lourds Cd, Hg, Pb et Zn. En effet, l'utilisation de cellules vivantes permet une évaluation de la biodisponibilité et de la toxicité du milieu provoquée par les métaux lourds. En effet, on mesure une réponse physiologique de la bactérie à la présence de métaux lourds. Mais cette réponse est influencée par des facteurs environnementaux multiples (Briscoe *et al.*, 1996).

Nous avons constaté que la réponse de la souche rapporteur était altérée principalement par le pH, la phase de croissance des bactéries, et par la composition du milieu qui doit permettre une production de lumière suffisante, ce qui implique notamment la production de l'aldéhyde (Heitzer *et al.*, 1998), tout en gardant les ions des métaux lourds disponibles pour la bactérie. Nous avons choisi un milieu minimum (GGM) à pH 6,5 qui ne contient pas de substances chélatantes ou précipitantes, et qui permet à la bactérie une production de lumière intense.

Pour garder les cultures toujours à un stade de développement identique, les bactéries sont récupérées par centrifugation en phase stationnaire et remises dans du milieu frais afin d'éviter toutes modifications du milieu résultant de l'activité microbienne. Nous avons montré que la réponse des cellules est maximale au début de phase exponentielle de croissance. Pour la mesure, la culture bactérienne est incubée à un volume maximale de 10% de l'échantillon à tester par rapport milieu réactionnel afin d'éviter une dilution trop importante ou des altérations de la réponse par des substances provenant de l'échantillon.

Le protocole de mesure de bioluminescence ainsi développé, nous a permis la détection de 0,01 μM de Cd, 0,03 μM de Pb, 0,1 μM de Hg et 0,3 μM de Zn dans des conditions optimisées. La reproductibilité des essais, même dans des conditions standardisées, est comprise dans un intervalle d'erreur de 30%, un taux trop élevé pour une application comme outil d'analyse environnementale quantitative.

I.3. Applications à l'analyse de matrices complexes

L'avantage de ce biocapteur est qu'il détecte des quantités de métaux biodisponibles dans des échantillons. En effet, grâce à des tests de bioluminescence en présence d'un chélateur de métaux (EDTA) et d'un anion qui précipite des métaux lourds (S^{2-}), nous avons montré que la disponibilité des métaux pour la souche rapporteur baisse considérablement, ce qui se traduit par un signal de luminescence modifié. Ainsi, la réponse luminescente de MG1655/pZNT::lux n'indique que les quantités de métaux lourds qui sont disponibles pour la bactérie, ce qui permet une évaluation du risque provenant d'une contamination aux métaux lourds.

Des essais préliminaires du biocapteur sur des sols artificiellement contaminés ont révélé que la détection des métaux est possible, même par application directe de la suspension bactérienne sur le sol. La réponse de la souche rapporteur ne révèle pas la charge totale en métaux dans le sol, indiquant ainsi que la disponibilité des ions est altérée dans cette matrice complexe. Les essais effectués sur des lixiviats des sols ont montré que la teneur en métal biodisponible est encore réduite. Pourtant, des procédés de lixiviation sont fréquemment utilisés pour évaluer la biodisponibilité des métaux dans un échantillon (Rauret, 1998). Nous constatons qu'un essai de bioluminescence par application directe sur un sol s'avère être une méthode plus simple et mieux adaptée pour une telle évaluation.

Un problème reste la distinction des métaux dans un échantillon. Lorsque plusieurs métaux inducteurs sont présents, la réponse de MG1655/pZNT::lux s'oriente vers le plus fort inducteur présent. Ainsi, dans des conditions particulières, certains des métaux lourds peuvent rester non-détectables. Mais les métaux lourds détectés par ce biocapteur, notamment Cd, Hg et Pb, sont des substances non-essentiels et toxiques qui posent des problèmes dans l'environnement (Babich et Stotzky, 1980).

Avec ce système de biocapteur basé sur MG1655/pZNT::lux il est donc possible de détecter des quantités biodisponibles de cadmium, de mercure, de plomb et de zinc dans des matrices complexes que représentent les sols. Cette méthode est facile et rapide à mettre en œuvre et, de plus, s'avère peu coûteuse. En revanche, une analyse quantitative n'est pas

possible avec cet outil, mais il donne une évaluation qualitative, voir semi-quantitative, de la teneur en métaux lourds dans un échantillon.

II. Perspectives

Le biocapteur tel qu'il a été développé et mis en œuvre dans ce travail possède deux inconvénients majeurs : d'une part, la reproductibilité de l'essai n'est pas fiable, ne permettant ainsi aucune évaluation quantitative de métaux, d'autre part, cet essai ne permet pas de distinguer les différents métaux qui induisent la transcription de la fusion *zntA::lux*.

II.1. Reproductibilité de l'essai de bioluminescence

L'utilisation des cellules vivantes a certes des avantages dans l'analyse environnementale ; cependant, leur utilisation a pour inconvénient une réponse instable. En effet, l'expression génétique varie fortement selon l'état physiologique de la cellule. Or, il faut minimiser les variations dans la culture cellulaire, ainsi que les variations du milieu.

Il serait possible d'utiliser des cellules lyophilisées. L'avantage de leur utilisation est qu'elles restent inertes aux influences externes, et que leur physiologie reste inchangée, permettant ainsi une meilleure reproductibilité et précision des essais de bioluminescence. Il a été montré dans la littérature que l'utilisation des cellules lyophilisées par rapport à l'utilisation des cellules fraîches pour des tests de bioluminescence comparables n'influence pas leur réponse envers des toxiques (Lampinen *et al.*, 1995 ; Tauriainen *et al.*, 2000). De plus, les cellules rapporteurs lyophilisées peuvent être stockées facilement et transportées vers les lieux de l'utilisation sans risque de changements au niveau de la réponse. La reconstitution des cellules est un processus qui peut être effectué facilement et rapidement de 15 à 30 min avant l'application. Combiné avec des luminomètres portables, l'utilisation des cellules lyophilisées permettrait des mesures sur le terrain.

Un autre moyen de conserver la souche rapporteur dans un état physiologique stable serait de piéger les cellules dans une matrice de polymères naturels ou synthétiques. En effet, les bactéries peuvent être enfermées dans une telle matrice hydratée qui permet un approvisionnement en nutriments et cofacteurs qui sont nécessaires à la survie cellulaire. De

plus, les cellules immobilisées dans un polymère maintiennent une stabilité des plasmides (Corbisier *et al.*, 1999).

Les cellules sont enfermées dans une matrice d'agar, d'alginate, de polyuréthane ou encore de polyacrylamide lors de la polymérisation, et cette matrice peut être placée dans un dispositif relié à un photodétecteur. La matrice est ainsi immergée dans un environnement dont on peut maîtriser des facteurs comme le pH, la température, l'oxygénation, la salinité etc. ainsi que les nutriments, de sorte que les effets environnementaux et physiologiques sur la réponse pourraient être minimisés et contrôlés (Simpson *et al.*, 1998).

Grâce à l'immobilisation des bactéries, des mesures en continu des effluents ont été élaborées (Heitzer *et al.*, 1994). Dans ce cas, le polymère a été immergé dans un flux de milieu combiné avec l'échantillon à tester. La lumière produite a été mesurée en continu et enregistrée en fonction des conditions d'essai qui ont été utilisées.

L'utilisation de l'expression de *zntA* pour quantifier la teneur en métaux lourds d'un échantillon pourrait être effectuée par hybridation sur des ADN microarrays (Brocklehurst et Morby, 2000 ; Wang, 2000). Pour cette technologie, il n'y a pas besoin de fusions génétiques, car l'ARN messager de *zntA* serait directement extrait des cellules d'*E. coli* exposées à un échantillon, puis quantifié par hybridation avec de l'ADN complémentaire fixé sur un support de silice. La visualisation de la quantité d'ARN hybridée est généralement effectuée par mesure optique ou électrochimique (Millan et Mikkelsen, 1993). Il est imaginable de créer un ADN microarray pour une série de réponses génétiquement programmées aux stress environnementaux, qui permettrait une évaluation de la contamination totale d'un échantillon.

II.2. Spécificité pour les métaux lourds

La souche rapporteur MG1655/pZNT::*lux* répond à 4 métaux lourds sans possibilité de distinguer lequel des métaux est présent. Mais il y a un moyen de compléter l'information donnée par MG1655/pZNT::*lux* en utilisant d'autres fusions génétiques avec les gènes rapporteurs *lux*. Un certain nombre de fusions plus ou moins spécifiques à des métaux lourds particuliers ont déjà été développées, telles que *mer*::*lux* pour le mercure ou *cadA*::*lux* pour le cadmium (Selifonova *et al.*, 1993 ; Corbisier *et al.*, 1993). Plusieurs gènes répondant aux métaux lourds spécifiques pour la quasi-totalité des métaux existants ont été découverts récemment (Silver, 1998) avec la possibilité d'en créer des fusions avec *lux*. Ainsi, nous

avons développé dans notre laboratoire une fusion *copA::luxCDABE* qui répond spécifiquement au cuivre et à l'argent (résultats non-publiés). Si on utilise une telle batterie de tests de bioluminescence, il est certes imaginable d'avoir des informations complémentaires sur un polluant spécifique, mais cette batterie permettrait également de cribler tous les polluants métalliques présents dans un échantillon.

Du point de vue biochimique, la fusion *zntA::lux* telle qu'elle est présente sur le plasmide pZNT::lux, traduit la présence de métaux lourds par un signal de luminescence détectable. La composante cellulaire qui capte les métaux lourds dans la cellule est la protéine régulatrice ZntR. Cette protéine présente une structure tertiaire particulière au niveau du site de fixation des métaux avec une affinité pour le zinc, le cadmium, le plomb et le mercure (Brocklehurst *et al.*, 1999 ; Outten *et al.*, 1999). Un moyen de changer la spécificité de ce site de fixation serait de modifier par mutagenèse la structure de la protéine à partir de sa séquence, comme déjà montré dans le cas de MerR (Caguiat *et al.*, 1999). Pour modifier l'affinité de la protéine régulatrice, il est possible de s'inspirer de la structure d'autres protéines de la même famille telles que CoaR, CopR, SoxR, PMTR ou autres, qui présentent une spécificité pour d'autres métaux. Pazirandeh *et al.* (1998) ont même proposé une protéine synthétique pour fixer des métaux lourds. Tant que ces modifications de la protéine régulatrice n'altèrent pas l'activation de transcription, elles constitueraient un moyen d'affinement de la spécificité.

Bontidean *et al.* (2000) ont proposé une application directe *in vitro* des protéines qui sont capables de fixer les métaux en les liant sur une électrode en or. La présence de métaux ou la fixation des métaux aux protéines est ensuite détectée par un changement du potentiel électrique. Dans l'exemple présenté, ce couplage directe de la composante biologique que représente la protéine SmtA des cyanobactéries avec une électrode permet une détection des métaux lourds mercure et cuivre avec une grande sensibilité de 10^{-15} M.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alexander, D.C., DuBow, M.S. (1998) Probing for promoters with luciferase transposons. *Methods Mol. Biol.* 102, 105-122.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Anderson, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., Molin, S. (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in Bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 64, 2240-2246.
- Ansari, A.Z., Bradner, J.E., O'Halloran, T.V. (1995) DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature* 374, 371-375.
- Applegate, S.M., Kehrmeyer, S.R., Sayler, G.S. (1998) A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene and xylene sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2730-2735.
- Babai, R., Ron, E.Z. (1998) An *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals. *FEMS Microbiol. Letters* 167, 107-111.
- Babich, H., Stotzki, G. (1977) Effects of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria on soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Env. Microbiol.* 33, 1059-1063.
- Babich, H., Stotzki, G. (1979) Abiotic factors affecting the toxicity of lead to fungi. *Appl. Env. Microbiol.* 38, 506-511.
- Babich, H., Stotzki, G. (1980) Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 99-145.
- Barkay, T., Gillman, M., Turner, R.R. (1997) Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4267-4271.
- Beard, S.J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M.N., Poole, R.K. (1997) Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12 : evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol. Microbiol.* 25, 883-891.
- Beard, S.J., Hashim, R., Wu, G., Binet, M.R.B., Hughes, M.N., Poole, R.K. (2000) Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 194, 231-235.
- Belkin, S., Smulski, D.R., Vollmer, A.C., Van Dyk, T.K., LaRossa, R.A. (1996) Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a *katG'::lux* fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2252-2256.
- Belkin, S., Smulski, D.R., Dadon, S., Vollmer, A.C., Van Dyk, T.K., LaRossa, R.A. (1997) A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants, *Wat. Res.* 31, 3009-3016.

- Ben-Israel, O., Ben-Israel, H., Ulitzur, S. (1998) Identification and Quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying *lux* genes fused to stress promoters 64, 4346-4352.
- Berg, C.M., Berg, D.E. (1996) Transposable element tools for microbial genetics. Dans: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (ed.), ASM Press Washington DC, 2nd edition, 2588-2612.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, R., Van Den Heuvel, R., Verschaeffe, L., Weltens, R., Schoeters, G. (1998) Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37, 2935-2947.
- Billard, P., DuBow, M.S. (1998) Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories. *Clinical Biochem.* 31, 1-14.
- Binet, M.R.B., Poole, R.K. (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-translocating P-type ATPase *ZntA* in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 473, 67-70.
- Bingham, R.J., Hall, K.S., Slonczewski, J.L. (1990) Alkaline induction of a novel gene locus, *alx*, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 2184-2186.
- Blaise, C., Forgani, R., Legault, R., Guzzo, J., DuBow, M.S. (1994) A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry, and Microtox reagent. *BioTechniques* 16, 932-937.
- Blouin, K., Walker, S.G., Smit, J., Turner, R.F.B. (1996) Characterization of *in vivo* reporter systems for gene expression and biosensor applications based on *luxAB* luciferase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2013-2021.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977) Construction and characterisation of new cloning vesicles. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Bontidean, I., Lloyd, J.R., Hobman, J.L., Wilson, J.R., Csoregi, E., Mattiasson, B., Brown, N.L. (2000) Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *J. Inorg. Biochem.* 79, 225-229.
- Bremer, H., Dennis, P.P. (1996) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. Dans: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (ed.), ASM Press Washington DC, 2nd edition, 1553-1569.
- Briscoe, S.F., Cai, J., DuBow, M.S. (1996) Luminescent bacterial biosensors for the rapid detection of toxicants. Dans: *Microscale aquatic toxicology – advances, techniques and practice*, Wells, P.G., Lee, K., Blaise, C.; eds., CRC Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Brocklehurst, K.R., Hobman, J.L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S.J., Brown, N.L., Morby, A.P. (1999) *ZntR* is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31, 93-902.
- Brocklehurst, K.R., Morby, A.P. (2000) Metal tolerance in *Escherichia coli* analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. *Microbiology* 146, 2277-2282.

- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to heavy metals in the environment. *Ecotoxicity Environ. Safety* 45, 198-207.
- Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes, J.R., Cox, D.W. (1993) The Wilson disease is a copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.* 5, 327-337.
- Burlage, R.S., Sayler, G.S., Larimer, F. (1990) Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with *nah-lux* transcriptional fusions. *J. Bacteriol.* 172, 4749-4757.
- Caguiat, J.J., Watson, A.L., Summers, A.O. (1999) Cd(II)-responsive and constitutive mutants implicate a novel domain in MerR. *J. Bacteriol.* 181, 3462-3471.
- Cai, J., DuBow, M.S. (1996) Expression of the *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon. *Can. J. Microbiol.* 42, 662-671.
- Campbell, C.D., Hird, M., Lumsdon, D.G., Meeussen, J.C.L. (2000) The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*. *Chemosphere* 40, 319-325.
- Casadaban, M.J., Cohen S.N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4530-4533.
- Cebolla, A., Vazquez, M.E., Palomares, A.J. (1995) Expression vectors for the use of eucaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3259-3272.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chang, A.C., Cohen, S. (1978) Construction and characterisation of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- Checkai, R.T., Corey, R.B., Helmke, P.A. (1987) Effects of ionic and complexed metal concentrations on plant uptake of cadmium and micronutrient metals from solution. *Plant and Soil* 99, 335-345.
- Chen, X.J., Wesotowski-Lowel, M., Fukuhara, H. (1992) Glucose transport in the yeast *Klyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 233, 97-105.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Pendergast, F.G., Ward, W.W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequoria* green fluorescent protein. *Biochemistry* 32, 1212-1218.
- Collard, J.M., Corbisier, P., Diels, L., Dong, Q., Jeanthon, C., Mergeay, M., Taghavi, S., van der Lelie, D., Wilmotte, A., Wuertz, S. (1994) Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophius* CH34: mechanisms and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 405-414.

- Collins, Y.E., Stotzky, G. (1989) Factors affecting the toxicity of heavy metals to microbes. Dans: Beveridge, T.J. et Doyle, R.J. (eds.), *Metal ions and bacteria*. Wiley, Toronto, 55-64.
- Corbisier, P., Ji, G., Nuyts, G., Mergeay, M., Silver, S. (1993) *luxAB* gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *FEMS Microbiol. Letters* 110, 231-238.
- Corbisier, P. (1997) Bacterial metal-lux biosensors for a rapid determination of the heavy metal bioavailability and toxicity in solid samples. *Research in Microbiology* 148, 534-536.
- Corbisier, P., van der Lelie, D., Borremans B., Provoost, A., de Lorenzo, V., Brown, N.L., Lloyd, J.R., Hobman, J.L., Csöregi, E., Johansson, G., Mattiasson B. (1999) Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of heavy metals in environmental samples. *Analytica Chimica Acta* 387, 235-244.
- De Haan, F.A.M., van Riemsdijk, W.H., Van der Zee, S.E.A.T.M. (1993) General concepts of soil quality. Dans : *Integrated soil and sediment research: a basis for proper protection*, Eijsackers, H.P.G., Hamers, T. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 155-170.
- Diamond, J.M. (1987) Human use of world resources. *Nature*, 328, 479-480.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., DuBow, M.S. (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177, 2050-2056.
- Dougan, G., Haque, A., Pickard, D., Frankel, G., O'Goara, P., Wain, J. (2001) The *Escherichia coli* gene pool. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 90-94.
- DuBow, M.S. (1997) Luminescence-based assays to detect and characterise chemical and biological water contaminants. Dans: *Biotechnology for water use and conservation, The Mexico '96 workshop*. OECD Documents 149-155.
- Endo, G., Silver, S. (1995) CadC, the regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.*, 177, 4437-4441.
- Engbrecht, J., Simon, M., Silverman, M. (1985) Measuring gene expression with light. *Science* 227, 1345-1347.
- Erbe, J.L., Adams, A.C., Taylor, K.B., Hall, L.M. (1996) Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. *J. Ind. Microbiol.* 17, 80-83.
- Errampali, D., Leung, K., Cassidy, M.B., Kostrzynska, M., Blears, M., Lee, H., Trevors, J.T. (1999) Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 35, 187-199.
- Falbe, J., Regitz, M. (1995) *Römpp Chemie Lexikon*. 9. verb. u. korr. Aufl. auf CD-ROM, Version 1,0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

- Farinha, M.A., Kropinski, A.M. (1990) Construction of a broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J. Bacteriol.* 172, 3496-3499.
- Farrah, H., Pickering, W.F. (1977) The sorption of cadmium and lead by clay minerals. *Aust. J. Chem.* 30, 1417.
- Farrah, H., Pickering, W.F. (1978) The sorption of mercury species by clay minerals. *Water, Air, Soil Pollut.* 9, 23-28.
- Filella, M., Town, R.M. (2000) Determination of ion binding parameters for humic substances, Part 1. Application of a simple calculation method for extraction of meaningful parameters from reverse pulse polarograms. *J. Electroanal. Chem.* 485, 21-33.
- Florence, T.M. (1977) Trace metal species in fresh waters. *Water Res.* 11, 681-687.
- Förstner, U., Salomons, W. (1991) Mobilization of metals from sediments. Dans: *Metals and their compounds in the environment*. Merian, E. (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 469-479.
- Fuentes, A.M., Amabile-Cuevas, C.F. (1997) Mercury induces multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* through activation of SoxR, a redox-sensing regulatory protein. *FEMS Microbiol. Letters* 154, 385-388.
- Furukawa, K., Miyazaki, T. (1986) Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.* 166, 392-398.
- Gadd, G.M. (1992) Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiol. Letters* 100, 197-204.
- Gadd, G.M., Griffiths, A.J. (1978) Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* 4, 303-309.
- Gatti, D., Mitra, B., Rosen, B.P. (2000) *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J. Biol. Chem.* 275, 34009-34012.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389-1414.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A. (1990) *Chemie der Elemente*. 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage – VCH Weinheim; Basel; Cambridge; New York; p. 1557-1561.
- Groisman, E.A. (1991) *In vivo* engineering with bacteriophage Mu. *Methods Enzymol.* 204, 180-212.
- Guzzo, A., DuBow, M.S. (1991) Construction of stable, single-copy luciferase fusions in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 156, 144-149.
- Guzzo, A., Diorio, C., DuBow, M.S. (1991) Transcription of the *Escherichia coli* *fliC* gene is regulated by metal ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2255-2259.

- Guzzo, J., Guzzo, A., DuBow, M.S. (1992) Characterization of the effects of aluminium on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. *Toxicol. Letters* 64/65, 687-693.
- Guzzo, A., DuBow, M.S. (1994a) Identification and characterization of genetically programmed responses to toxic metal exposure in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 369-374.
- Guzzo, A., DuBow, M.S. (1994b) A *luxAB* transcriptional fusion to the cryptic *celF* gene of *Escherichia coli* displays increased luminescence in the presence of nickel. *Mol. Gen. Genet.* 242, 455-460.
- Guzzo, J., DuBow, M.S. (2000) A novel selenite- and tellurite-inducible gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4972-4978.
- Hahne, H.C.H., Kroontje, W. (1973) Significance of pH and chloride concentrations on behaviour of heavy metal pollutants: mercury(II), cadmium(II), zinc(II) and lead(II). *J. Environ. Qual.* 2, 444-253.
- Hansen, L.H., Sorensen, S.J. (2000) Detection and quantification of tetracyclines by whole-cell biosensors. *FEMS Microbiol. Letters* 190, 273-278.
- Hapke, H.-J. (1991) Metal accumulation in the food chain and load of feed and food. Dans: *Metals and their compounds in the environment*. Merian, E. (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 469-479.
- Hart, B.A., Scaife, B.D. (1977) Toxicity et bioaccumulation de cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Res.* 14, 401-413.
- Hay, A.G., Rice, J.F., Applegate, B.M., Bright, N.G., Sayler, G.S. (2000) A bioluminescent whole-cell reporter for detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4589-4594.
- Heitzer, A., Webb, O.F., Thonnard, J.E., Sayler, G.S. (1992) Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1839-1846.
- Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J.E., Bienkowski, P.R., White, D.C., Sayler, G.S. (1994) Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1487-1494.
- Heitzer, A., Applegate, B., Kehrmeier, S., Pinkart, H., Webb, O.F., Phelps, T.J., White, D.C., Sayler, G.S. (1998) Physiological considerations of environmental applications of *lux* reporter fusions. *J. Microbiol. Methods* 33, 45-57.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dannis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334.

- Hughes, M.N., Poole R.K. (1991) Metal speciation and microbial growth – the hard (and the soft) facts. *J. Gen. Microbiol.* 137, 725-734.
- Huisman, G.W., Siegele, D.A., Zambrano, M.M., Kolter R. (1996) Morphological and physiological changes during stationary phase. Dans: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (ed.), ASM Press Washington DC, 2nd edition, 1672-1682.
- Itoh, N., Kouzai, T., Koide, Y. (1994) Efficient transformation of *Pseudomonas* strains with pNI vectord by electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1306-1308.
- Jacob, F., Ullman, A., Monod, J. (1965) Délétions fusionnant l'opéron lactose et un opéron purine chez *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 42, 511-52.
- Jaspers, M.C.M., Suske, W.A., Schmid, A., Goslings, D.A.M., Kohler, H.-P.E., van der Meer, R.J. (2000) HpbR, a new member of the XylR/DmbR subclass within the NtrC family of bacterial transcriptional activators, regulates expression of 2-hydroxybiphenyl metabolism in *Pseudomonas azelaica* HBP1. *J. Bacteriol.* 182, 405-417.
- Jensen, K.J. (1993) The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* 175, 3401-3407.
- Jones, K.C., Symon, C.J., Johnston, A.E. (1987) Retrospective analysis of an archived soil collection II. Cadmium. *Sci. Total Environ.* 61, 857-865.
- Keddy, C.J., Greene, J.C., Bonnell, F.A. (1995) Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 30, 221-251.
- Kleckner, N., Bender, J., Gottesman, S. (1991) Uses of transposons with emphasis on Tn10. *Methods Enzymol.* 204, 139-179.
- Klimowski, L., Rayms-Keller, A., Olson, K.E., Yang, R.S.H., Tessari, J., Carlson, J., Beaty, B. (1996) Inducibility of a molecular bioreporter system by heavy metals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 85-91.
- Kogoma, T., Farr, S.B., Joyce, K.M., Natvig, D.O. (1988) Isolation of gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85, 4799-4803.
- Kragelund, L., Hosbond, C., Nybroe, O. (1997) Distribution of metabolic activity and phosphate starvation response of *lux*-tagged *Pseudomonas fluorescens* reporter bacteria in the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4920-4928.
- Krenkel, P.A. (1974) Mercury: Environmental considerations, part II. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 4, 251-264.
- Kroos, L., Kaiser, D. (1984) Construction of a Tn5*lac*, a transposon, that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5816-5820.

- Lampinen, J., Virto, M., Karp, M. (1995) Use of controlled luciferase expression to monitor chemicals affecting protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2981-2989.
- Layton, A.C., Muccini, M., Ghosh, M.M., Sayler, G.S. (1998) Construction of a bioluminescent reporter strain to detect polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5023-5026.
- Loper, J.E., Lindow, S.E. (1997) Reporter gene systems useful in evaluating gene expression by soil- and plant-associated bacteria. Dans: *Manual of environmental Microbiology*, Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInery, M.J., Stetzenbach, C.D., Walter, M.V. (eds.), ASM Press, Washington DC, 482-492.
- Lovley, D.R., Coates, J.D. (1997) Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 285-289.
- Lutsenko, S., Kaplan, J.H. (1995) Organization of P-type ATPases : Significance of structural diversity. *Biochemistry* 34, 15607-15613.
- Marosits, E., Polyak, K., Hlavay, J. (2000) Investigation on the chemical bonding of copper ions on different soil samples. *Microchemical Journal* 67, 219-226.
- Meighen, E.A. (1988) Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 123-142.
- Meighen, E.A. (1991) Molecular biology of bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142.
- Meighen, E.A. (1994) Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Genet.* 28, 117-139.
- Metcalf, W.W., Steed, P.M., Wanner, B.L. (1990) Identification of phosphate starvation-inducible genes in *Escherichia coli* K-12 by DNA sequence analysis of *psi::lacZ*(Mud1) transcriptional fusions. *J. Bacteriol.* 172, 3191-3200.
- Millan, K.M., Mikkelsen, S.R. (1993) Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Anal. Chem.* 65, 2317-2323.
- Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics. Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Min, J., Kim, E.J., LaRossa, R.A., Gu, M.B. (1999) Distinct responses of a *recA::luxCDABE* *Escherichia coli* strain to direct and indirect DNA damaging agents. *Mutation Research* 442, 61-68.
- Misra, T.K. (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 27, 4-16.
- Morgan, J.J., Stumm, W. (1991) Chemical processes in the environment, relevance of chemical speciation. Dans: *Metals and their compounds in the environment*. Merian, E. (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 67-103.

- Murata, K., Fukuda, Y., Shimosaka, M., Wantanabe, K., Saikusa, T., Kimura, A. (1985) Phenotypic character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1200-1207.
- Narbonne, J.F. (1996) Effets toxiques du mercure: estimation des doses tolérables en cas d'ingestion, dans : Plomb, cadmium et mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, conseil supérieur d'hygiène publique de France, Technique & Documentation, Paris. 177-180.
- Neilsen, J.W., Pierce, S.A., Maier, R.M. (1999) Factors influencing expression of *luxCDABE* and *nah* genes in *Pseudomonas putida* RB1353(NAH7, pUTK9) in dynamic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3473-3482.
- Nies, D.H. (1992) Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid* 27, 17-28.
- Noll, M., Petrukhin, K., Lutsenko, S. (1998) Identification of a novel transcription regulator from *Proteus mirabilis*, PTMR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273, 21393-21401.
- Nriagu, J.O. (1989) A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338, 47-49.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134-139.
- Odermatt, A., Suter, H., Krapf, R., Solioz, M. (1993) Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol. Chem.* 268, 12775-12779.
- Outten, C.E., Outten, F.W., O'Halloran, T.V. (1999) DNA Distortion Mechanism for Transcriptional Activation by ZntR, a Zn(II)- responsive MerR Homologue in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274, 37517-37524.
- Outten, C.E., Outten, F.W., Hale, J., O'Halloran, T.V. (2000) Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. 275, 31024-31029.
- Palmer, G., McFadzean, R., Killham, K., Sinclair, A., Paton, G.I. (1998) Use of *lux*-based biosensors for rapid diagnosis of pollutants in arable soils. *Chemosphere* 36, 2683-2697.
- Palomares, A.J., de Luca, M.A., Helinski, D.R. (1989) Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other gram negative bacteria. *Gene* 81, 55-64.
- Patzer, S.I., Hantke, K. (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28, 1199-1210.

- Pazirandeh, M., Wells, B.M., Ryan, R.L. (1998) Development of bacterium-based heavy metal biosorbents: enhanced uptake of cadmium and mercury by *Escherichia coli* expressing a metal binding motif. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4068-4072.
- Peitzsch, N., Eberz, G., Nies, D.H. (1998) *Alcaligenes eutrophius* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 453-458.
- Pedersen, P.L., Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends Biochem. Sci.* 12, 186-189.
- Peterson, C., Moller, L.B. (2000) Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene* 261, 289-298.
- Petrilli, F.L., de Flora, S. (1977) Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 805-809.
- Poole, R.K., Williams H.D., Downie, J.A., Gibson, F. (1989) Mutations affecting the cytochrome d-containing oxidase complex of *Escherichia coli* K12: identification and mapping of a fourth locus, *cydD*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1865-1874.
- Prest, A.G., Winson, M.K., Hammond, J.R., Stewart, G.S. (1997) The construction and application of a *lux*-based nitrate biosensor. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 355-360.
- Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., Hofnung, M. (1982) SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5971-5975.
- Ramamoorthy, S., Springthorpe, S., Kushner, D.J. (1977) Competition for mercury between river sediment and bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 505-511.
- Rasmussen, B. (2000) Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old vulcanogenic sulphide deposit. *Nature* 405, 676-679.
- Rasmussen, L.D., Turner, R.R., Barkay, T. (1997) Cell-density-dependent sensitivity of a *mer-lux* Bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3291-3293.
- Rasmussen, L.D., Sorensen, S.J., Turner, R.R., Barkay, T. (2000) Application of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 639-646.
- Rattray, E.A.S., Prosser, J.I., Killham, K., Glover, L.A. (1990) Luminescence-based nonextractive technique for *in situ* detection of *Escherichia coli* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3368-3374.
- Rauret, G. (1998) Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46, 449-455.
- Rensing, C., Mitra, B., Rosen, B.P. (1997) The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II) translocating ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14326-14331.

- Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B., Rosen, B.P. (1998) Pb(II) translocating P-type ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 32614-32617.
- Riether, K.B., Billard, P., DuBow, M.S. (2000) Luminescent gene fusion biosensors to detect and characterize genetically-programmed responses to environmental pollutants. *Recent Res. Devel. Microbiology* 4, 349-355.
- Roane, T.M., Pepper, I.L. (2000) Microorganisms and metal pollution. Dans : *Environmental microbiology*, Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (eds.), Academic Press, London, 403-422.
- Rogowsky, P.M., Close, T.J., Chimera, J.A., Shaw, J.J., Kado, C.I. (1987) Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 169, 5101-5112.
- Rönnpapel, K., Liß, W., Ahlf, W. (1995) Microbial Bioassays of solid-associated contaminants. *Ecotox. Environ. Safety* 31, 99-103.
- Rosbach, S., Wilson, T.L., Kukuk, M.L., Carty H.A. (2000) Elevated zinc induces siderophore biosynthesis genes and a *zntA*-like gene in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Letters* 191, 61-70.
- Rozen, Y., Nejidat, A., Gartemann, K.H., Belkin, H. (1999) Specific detection of p-chlorobenzoic acid by *Escherichia coli* bearing a plasmid-borne *fcxA::lux* fusion. *Chemosphere*. 38, 633-641.
- Rutherford, J.C., Cavet, J.S., Robinson, N.J. (1999) Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 25827-25832.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain determining inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schmitt, H.W., Sticher, H. (1991) Heavy metal compounds in the soil. Dans: *Metals and their compounds in the environment*. Merian, E. (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 311-331.
- Schweizer, H.P. (1993) Two plasmids, X1918 and Z1918, for easy recovery of the *xylE* and *lacZ* reporter genes. *Gene* 134, 89-91.
- Selifonova, O., Burlage, R., Barkay, T. (1993) Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3083-3090.
- Selifonova, O.V., Eaton, R.W. (1996) Use of a, *ipb-lux* fusion to study regulation of the isopropylbenzene catabolism operon of *Pseudomonas putida* RE204 and to detect hydrophobic pollutants in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 778-783.
- Sethi, S. (1994) Transducer aspects of biosensors. *Biosensors Bioelectronics* 9, 243-264.

- Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B.P., Mitra, B. (2000) The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 3873-3878.
- Silcock, D., Waterhouse, R.N., Glover, L.A., Prosser, J.I., Killham, K. (1992) Detection of a single genetically modified bacterial cell in soil by using a charged coupled device-enhanced microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2444-2448.
- Silhavy, T.J., Beckwith, J.R. (1985) Uses of *lac* fusions for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.* 49, 398-418.
- Silver, S. (1992) Plasmid-determined metal resistance mechanisms: range and overview. *Plasmid* 27, 1-3.
- Silver, S. (1996a) Transport of inorganic cations. Dans: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (ed.), ASM Press Washington DC, 2nd edition, 1091-1102.
- Silver, S. (1996b) Bacterial resistances to toxic metal ions – a review. *Gene* 179, 9-19.
- Silver, S. (1998) Genes for all metals – a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom award lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 1-12.
- Silver, S., Misra, T.K. (1988) Plasmid mediated heavy metal resistances. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 717-743.
- Silver, S., Nucifora, G., Phung, L.T. (1993) Human Menkes X chromosome disease and the staphylococcal cadmium resistance ATPase: a remarkable similarity in protein sequences. *Mol. Microbiol.* 10, 7-12.
- Silver, S., Phung, L.T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 5, 753-789.
- Silver, S., Walderhaug, M. (1992) Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 56, 195-228.
- Simpson, M.L., Saylor, G.S., Applegate, B.M., Ripp, S., Nivens, D.E., Paulus, M.J., Jellison, G.E. (1998) Bioluminescent-bioreporter integrated circuits form novel whole-cell biosensors. *TIBTECH*, 16, 332-338.
- Slauch, J.M., Silhavy, T.J. (1991) Genetic fusions as experimental tools. *Methods Enzymol.* 204, 213-248.
- Slonczowski, J.L., Foster, J.W. (1996) pH-regulated genes and survival at extreme pH. Dans: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (ed.), ASM Press Washington DC, 2nd edition, 1539-1549.
- Sofia, H.J., Burland, V., Daniels, D.L., Plunkett, G., Blattner, F.R. (1994) Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0-81.5 min. *Nucleic Acids Res.* 22, 2576-2586.

- Solioz, M., Vulpe, C. (1996) CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pumps heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* 21, 237-241.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Sposito, G. (1983) The chemical forms of trace metals in soils. Dans : *Applied environmental geochemistry*, Thornton, I. (ed.), Academic Press, London, 123-170.
- Steward, G.S.A.B., Williams, P. (1992) *lux* genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1289-1300.
- Sticher, P., Jaspers, M.C.M., Stemmler, K., Harms, H., Zehnder, A.J.B., van der Meer, J.R. (1997) Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4053-4060.
- Stratton, G.H. (1987) The effects of pesticides and heavy metals towards phototrophic microorganisms. Dans: *Reviews in environmental toxicology*. Hodgson, E. (ed.), Elsevier Science Publisher, Amsterdam, New York, Oxford, 71-147.
- Summers, A.O. (1986) Organization, expression, and evolution of genes for mercury resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 4, 607-634.
- Summers, A.O. (1992) Untwist and shout: A heavy metal-responsive transcription regulator. *J. Bacteriol.* 174, 3097-3101.
- Tauriainen, S., Karp M., Chang, W., Virta, M. (1997) Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl. Environ. Microbiol.* 163, 4456-4461.
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., Virta, M. (1998) Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensors Bioelectronics* 13, 931-938.
- Tauriainen, S., Virta, M.P.J., Karp, M.T. (2000) Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria. *Water Res.* 34, 2661-2666.
- Tibazarwa, C., Wuertz, S., Mergeay, M., Wyns, L., van Der Lelie, D. (2000) Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J. Bacteriol.* 182, 1399-409.
- Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., van der Lelie, D. (2001) A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environmental Pollution.* 113, 19-26.
- Turner, J.S., Robinson, N.J. (1995) Cyanobacterial metallothioneins: biochemistry and molecular genetics. *J. Ind. Microbiol.* 14, 119-125.
- Valentine, C.R.I., Kado, C.I. (1989) Molecular genetics of IncW plasmids. Dans: *Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria*. Thomas, C.M. (ed.) Academic Press, London, 125-163.

- Van der Lelie, D., Corbisier, P., Baeyens, W., Wuertz, S., Diels, L., Mergeay, M. (1994) The use of biosensors for environmental monitoring. *Res. Microbiol.* 145, 67-82.
- Van Dyk, T.K., Smulski, D.R., Reed, T.R., Belkin, S., Vollmer, A.C., LaRossa, R.A. (1995) Responses to toxicants of an *Escherichia coli* strain carrying a *uspA'::lux* genetic fusion and an *E. coli* strain carrying a *grpE'::lux* fusion are similar. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4124-127.
- Vollmer, A.C., Belkin, S., Smulski, D.R., Van Dyk, T.K., LaRossa, R.A. (1997) Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'::lux*, *uvrA'::lux*, or *alkA'::lux* reporter plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2566-2571.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Pachman, S., Gitschier, J. (1993) Isolation of a candidate for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat. Genet.* 3, 7-13.
- Wall, L.A., Byers, D.M., Meighen, E.A., (1986) Intersubunit transfer of fatty acyl groups during fatty acid reduction. *J. Biol. Chem.* 159, 720-724.
- Walsh, C.T., Distefano, M.D., Moore, M.J., Shewchuk, L.M., Verdine, G.L. (1988) Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *FASEB J.* 2, 124-130.
- Wang, J. (2000) From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Res.* 28, 3011-3016.
- Welp, G., Brümmer, G.W. (1997) Microbial toxicity of Cd and Hg in different soils related to total and water-soluble contents. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 38, 200-204.
- White, C., Sayer, J.A., Gadd, G.M. (1997) Microbial solubilisation and immobilisation of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 503-516.
- Willardson, B.M., Wilkins, J.F., Rand, T.A., Schupp, J.M., Hill, K.K., Keim, P., Jackson, P.J. (1998) Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1006-1012.
- Wise, A.A., Kuske, C.R. (2000) Generation of novel bacterial regulatory proteins that detect priority pollutant phenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 163-169.
- Wu, J.H., Rosen, B.P. (1991) Regulation of the *ars* operon: the *arsR* gene product is a negative regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 5, 1331-1336.
- Zeng, Q., Stalhandske, C., Anderson, M.C., Scott, R.A., Summers, A.O. (1998) The core metal-recognition domain of MerR. *Biochemistry* 37, 15885-15895.
- Zhang, Y.-Z., Naleway, J.J., Larison, K.D., Huang, Z., Haugland, R.P. (1991) Detecting *lacZ* gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic β -galactosidase substrates. *FASEB J.* 5, 318-3113.
- Zilberstein, D., Agmon, V., Schuldiner, S., Padan, E. (1984) *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential, and cell growth. *J. Bacteriol.* 158, 246-252.

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Structure schématique de CadA de <i>S. aureus</i> (d'après Silver, 1996b).	22
Figure 2 : Modèle du complexe Zn-ZntR/P _{zntA} /RNAPol qui montre la structure du promoteur étendue (d'après Outten <i>et al.</i> , 1999).	23
Figure 3 : Représentation schématique d'un biocapteur.	24
Figure 4 : Principe de la fusion transcriptionnelle dans un biocapteur à gènes rapporteurs.	27
Figure 5 : Réactions catalysées par les luciférases eucaryotes et procaryotes.	30
Figure 6 : Diagramme des réactions biochimiques comprises dans la réponse de bioluminescence (d'après Heitzer <i>et al.</i> , 1998).	31
Figure 7 : Activité β-galactosidase de la souche HG7 en fonction de la concentration de HgCl ₂ .	61
Figure 8 : Cartographie de la fusion de HG7 par hybridation.	63
Figure 9 : Procédé schématique de l'isolement du fragment d'ADN contenant la fusion dans HG7.	65
Figure 10 : Carte de restriction de pHG18.	66
Figure 11 : Représentation schématique de la position et la direction des amorces utilisées pour le séquençage de pHG18.	67
Figure 12 : Séquence d'ADN du site d'insertion de Mud1 <i>lac</i> .	68
Figure 13 : Activité β-galactosidase du clone HG7 en présence de métaux lourds.	70
Figure 14 : Evolution de l'activité β-galactosidase d' <i>E. coli</i> DH10B/pHG18 en fonction du temps.	72
Figure 15 : Schéma de la construction plasmidique d'une fusion <i>zntA::luxCDABE</i> .	79
Figure 16 : Autoradiographie après 30 min d'exposition sur boîtes de Pétri avec 48 colonies de transformants des plasmides de II.1.1.	80
Figure 17 : Mesure de la luminescence d' <i>E. coli</i> DH10B/pZNT::lux en présence de CdCl ₂ , de HgCl ₂ , de Pb(NO ₃) ₂ et de ZnSO ₄ .	82
Figure 18 : Induction de luminescence d' <i>E. coli</i> DH10B/pZNT::lux (a) et MG1655/pZNT::lux (b) par des métaux lourds.	84
Figure 19 : Réponse de MG1655/pZNT::lux dans du milieu MN en présence de CdCl ₂ , HgCl ₂ , Pb(NO ₃) ₂ et ZnSO ₄ .	87
Figure 20 : Réponse d'une culture de MG1655/pZNT::lux dans du milieu MN avec 10% de LB en présence de CdCl ₂ , HgCl ₂ , Pb(NO ₃) ₂ et ZnSO ₄ .	87
Figure 21 : Evolution de la luminescence de MG1655/pZNT::lux en fonction du temps d'incubation avec des métaux lourds.	89
Figure 22 : Facteurs d'induction en fonction des concentrations de métaux lourds.	90
Figure 23 : Croissance de MG1655/pZNT::lux dans du milieu LB et GGM.	91
Figure 24 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en fonction du temps de culture.	92
Figure 25 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en présence de métaux lourds à différentes densités cellulaires.	94

Figure 26 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en fonction de l'acidité du milieu.....	95
Figure 27 : Processus de mesure de bioluminescence basé sur MG1655/pZNT::lux.....	96
Figure 28 : Cinétique de la bioluminescence de MG1655/pZNT::lux selon le protocole standardisé.....	97
Figure 29 : Induction de la bioluminescence de MG1655/pZNT::lux en selon le protocole standardisé.....	98
Figure 30 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en présence de CdCl ₂ , HgCl ₂ , Pb(NO ₃) ₂ et ZnSO ₄ , et des combinaisons de deux composés équimolaires.....	107
Figure 31 : Réponse de MG1655/pZNT::lux aux métaux lourds en présence des chélateurs EDTA (barres gris foncées) et Na ₂ S (barres claires).....	109
Figure 32 : Réponse de MG1655/pZNT::lux en présence du sol standard artificiellement contaminé.....	111
Figure 33 : Réponse de MG1655/pZNT::lux en présence lixiviats des sols de figure 32.....	113
Figure 34 : Luminescence de MG1655/pZNT::lux en présence des sols S1 et S3, et de leur lixiviat.....	115

Tableau 1 : Tableau périodique des éléments avec les métaux et métalloïdes importants pour les organismes (d'après Hughes et Poole, 1991).....	8
Tableau 2 : Les émissions naturelles et anthropiques d'éléments traces dans l'atmosphère (Unités : 10 ³ kg·an ⁻¹) d'après Nriagu (1989).....	11
Tableau 3 : Éléments traces d'origine anthropique dans les écosystèmes aquatiques (10 ⁶ kg·an ⁻¹) d'après Nriagu et Pacyna (1988).	12
Tableau 4 : Emissions mondiales d'éléments traces dans les sols (10 ⁶ kg·an ⁻¹ ; repris de Nriagu et Pacyna, 1988).	13
Tableau 5 : Exemples de ATPases de type P procaryotes et leurs régulateurs transcriptionnels correspondants.....	20
Tableau 6 : Exemples de fusions génétiques pour la détection des différents polluants.....	36
Tableau 7 : Caractéristiques des souches bactériennes utilisées dans cette étude.....	38
Tableau 8 : Caractéristiques des plasmides utilisés dans cette étude.....	38
Tableau 9 : Concentrations des solutions utilisées pour contaminer les sols et la teneur finale correspondant.....	58
Tableau 10 : Influence de <i>zntA</i> sur la résistance d' <i>E. coli</i> à la présence de HgCl ₂ , CdCl ₂ , Pb(NO ₃) ₂ et ZnSO ₄	71
Tableau 11 : Teneur maximum possible en métaux lourds dans le milieu réactionnel.....	110
Tableau 12: Teneur de sols S1 et S3 en Cd, Hg, Pb et Zn (cf. annexes).....	114

ANNEXE : ANALYSES DES SOLS

Sol standard (utilisé pour contamination artificielle)

(Analyse réalisée par LCDI, Marange – Silvange, 1998)

Caractéristiques : Sol de prairie brun, limono-argileux

P total	864 mg/kg
pH	8,08
Potentiel Rédox Eh	34,2 mV
Carbone Organique totale	47,7 g/kg
Azote total	1,9 g/kg
Bases Echangeables	13,7 g/kg
HCO ₃ ⁻	664 mg/kg
Cd	<1 mg/kg
Cr	38 mg/kg
Cu	23 mg/kg
Hg	<1 mg/kg
Ni	21 mg/kg
Pb	25 mg/kg
Zn	95 mg/kg

S1 (Analyse réalisée par l'IRH, Nancy, 1998)Caractéristiques : Sol d'agriculture brun lessivé, limono-argileux, enrichi artificiellement avec Cd(NO₃)₂, K₂Cr₂O₇, Pb(OAc)₂, Zn(OAc)₂.

pH	6,0
Carbone organique total	16,53 g/kg
Azote total	1,65 g/kg
Cd	20 mg/kg
Cr	890 mg/kg
Cu	25 mg/kg
Hg	<1 mg/kg
Mn	1740 mg/kg
Pb	850 mg/kg
Zn	2130 mg/kg

SIII (Analyse réalisée par l'IRH, Nancy, 1998)

Caractéristiques : Sol industriel pollué

Fraction Minérale	90,2% de la MS
Fraction Organique	9,8% de la MS
Cd	29,6 mg/kg mg/kg
Cr	342 mg/kg
Cu	201 mg/kg
Hg	2,24 mg/kg
Ni	1200 mg/kg
Zn	2270 mg/kg
PCB	289 mg/kg
HAP	5.3 mg/kg

ANNEXE : ARTICLE

Recent Res. Devel. Microbiology, 4 (2000): 349-355

Research Signpost
T.C. 36/248(1), Trivandrum-8, India.,
ISBN : 81 - 7736 - 014 - 0

Luminescent gene fusion biosensors to detect and characterise genetically-programmed responses to environmental pollutants

Karl B. Riether, Patrick Billard* and Michael S. DubowU.R. Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale, Université de Metz, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz Borny, France., *E-mail: billard@bridoux.sciences.univ-metz.fr

ABSTRACT

Recent advances in the application of reporter gene technology to environmental problems have led to the development of rapid and accurate assays for bioavailable environmental pollutants based on bacterial biosensors. Most of these are based on bioluminescent reporter systems and can serve as highly sensitive and convenient tool for the monitoring of specific chemical pollutants. In this review, the current status of these bacterial biosensors is presented, along with two recently created clones for the detection of bioavailable amounts of phosphorus and heavy metals.

INTRODUCTION

The environment is increasingly subjected to contamination by a number of toxic chemicals from human activities, leading to ecological and public health problems. The monitoring of these chemical contaminants, and the stress that they engender, is of considerable importance for environmental safety and preservation. In the past decade, considerable research has focused on the development of biosensors, which draw profit from the genetically-programmed responses of micro-organisms to various environmental stresses to assess the effects and bioavailable concentrations of specific pollutants. To date, bacteria and, to a lesser extent, yeasts constitute the main biocatalysts used as microbial biosensors.

These are engineered such that the detection events are converted into an easily quantifiable and processable signal.

BACTERIAL BIOSENSORS

An array of methods are available that allow the measurement of specific compounds in contaminated samples. These include physical and chemical techniques such as atomic absorption spectroscopy, high performance liquid chromatography and gas chromatography, and *in vitro* biochemical assays. Though these assays offer a high degree of sensitivity and specificity, their use can be hampered by constraints of cost, time, and technical requirements. Moreover, these analytical tools are unable to provide information on the contaminants bioavailability and biological activity. Some of these shortcomings have been resolved with the development of biological assays, which use living organisms such as bacteria, algae, invertebrates or fish to measure the amount of a toxicant in a sample. Although effective, these assays are also time consuming and often lack specificity. Therefore, research efforts have focused on the use of bacterial cells as biosensors, which is advantageous compared to other organisms in that they can be produced rapidly, in great quantity, with low cost, and consist of genetically defined homogeneous populations. Moreover, in contrast to biochemical

assays which exploit only one of combination enzyme/substrate or antigen/antibody, bacteria are living cells with multiple biochemical pathways whose complex regulation offers great potential for investigation into the precise effects of these pollutants on cell physiology.

When exposed to stressful environmental conditions such as elevated levels of toxic chemicals, or nutrient limitation, cells trigger specific responses that allow them to reorient their physiology and cope with the deleterious effects of the encountered stress. These responses, which are often evolutionary conserved, may lead to transcriptional modifications of a set of genes whose expression can be measured via reporter gene fusion technology. Because the level of transcriptional induction/repression of these stress responsive genes is generally proportional to the level of the stressing agent (in a defined concentration range), it becomes possible to detect and measure the bioavailable amount of specific agents in a sample, in virtually any formulation in which they are present. Moreover, such bacterial biosensors provide much needed information about the molecular mechanisms of action of a particular chemical, including the identification of active species/isomers and the synergism/antagonism of other compounds in the formulation or environment, which may play a role. In turn, identification of the genetic regulatory units and encoded proteins will ultimately provide the long-term benefits of prediction of the cell types, individuals and species, which may be at risk upon exposure to this agent.

REPORTER GENE TECHNOLOGY

Reporter genes are known DNA sequences that produce an enzyme that is readily assayed when expressed. In practice, the measurement of the expression of a gene requires the *in vivo* or *in vitro* insertion of the reporter gene, minus its own transcriptional regulatory sequences, somewhere downstream of a gene's regulatory signals, thus placing the expression of the reporter gene under the control of the gene to be studied. When the expression of the gene is induced (or repressed), the co-expressed, easily-assayed reporter gene is

similarly affected. Reporter gene technology has a long history of usefulness in the study of bacterial physiology, genetics and ecology [1, 2]. However, many reporter systems described so far do not fit all the criteria required for different biosensor applications. First, the marker gene, or its activity, should be absent from the sample to be tested. This is essential, especially when the sample contains indigenous populations that would contribute to increase the background level of the gene product when assayed. In addition, the bioreporter assay should be non-destructive, allowing repeated experiments on the same sample. Finally, it should provide real-time monitoring of the signal and be adaptable to automation in order to develop on-line assays.

Actually, two reporter systems fulfil the above requirements, both of which are based on the production of light. These include the luciferase enzymes from bacteria and eucaryotes, and green fluorescent protein (GFP) [3]. Bacterial luciferases, such those originating from the marine bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri*, are heterodimeric enzymes (encoded by the *luxAB* genes) that catalyze light emission in the range of 490 nm in the presence of O₂, a short chain aldehyde and reducing equivalents, usually FMNH₂. The luciferase enzymes from eucaryotes, such as that from the firefly (*Photinus pyralis*) or the click beetle (*Pyrophorus plagiophthalmus*), use luciferin as a cofactor, along with ATP. Because of this cofactor use, luciferase activity is linked to cellular physiology and viability. The green fluorescent protein is the source of fluorescent light emission in the jellyfish *Aequora victoria*. Purified GFP absorbs blue light at 395 nm and emits green light, maximally at 595 nm. This shift results from an autocyclization of a defined peptide sequence of the protein, producing a chromophore that is brightly fluorescent. Though GFP is a relatively new bioreporter [4], it is becoming increasingly popular as a marker of gene expression, protein targeting in living cells, and microorganisms in the environment [5]. The major advantage it provides lies primarily in that fluorescence (and thus measurement of gene expression) does not require the addition of exogenous substrate or cofactors, thus avoiding

the problem of sample destruction. The fluorescence can be generated simply by excitation with long UV wavelengths. Moreover, recent engineering and mutagenesis of GFP into chimeric proteins with different stability [6] and excitation or emission wavelengths is extending the usefulness of this bioreporter enzyme (for a review, see ref. [7]).

In the above reporter systems, light production can be measured accurately, rapidly and with great sensitivity using photon counting devices such as luminometers, scintillation counters, or charge coupled device video cameras for bioluminescence, and by fluorescent spectroscopy, fluorimeters, or confocal microscopy in the case of GFP.

ENVIRONMENTAL APPLICATIONS

The growing knowledge gleaned from the study of genetically-programmed responses to environmental stresses has been exploited to develop rapid assays for the chemicals microorganisms respond to. One of the first example is the use of bacteria to detect mutagens and carcinogens via the reporter gene fusion-based assay for SOS regulon induction (the SOS Chromotest) [8]. In this assay, the *sulA* gene from *Escherichia coli* was fused to a promoter-less *lacZ* reporter gene such that, upon exposure to a mutagen, the SOS response is induced, leading to

increased production of β -galactosidase that is easily assayed using colorimetric substrates. In the last decade, a number of such bacterial biosensors have been constructed to measure a variety of particular (classes of) chemicals (Table 1).

Two examples of such clones, recently created in our laboratory, and their potential applications are described below.

1) Assessment of bioavailable phosphates in water.

The wide use of phosphated detergents and fertilizers may lead to high concentrations of organic and inorganic phosphates in natural ground and surface waters. Because such contaminations are often responsible for the phenomenon of eutrophication, there is now a need to develop rapid and reliable assays to assess biologically available amounts of phosphates in environmental samples. Besides traditional chemical assays, different methods have been described, such as that based on bacterial growth [34] or phosphate dependent pyruvate oxidase reactions [35], that have proven sensitive enough to assess low Pi concentrations and are more appropriate to Pi measurement in natural waters.

Bacteria in most habitats undergo constant variations of nutrient availability. Since phosphorus is an essential component of cells (principally present in membrane lipids, lipopolysaccharides and nucleic acids), its metabolism involves numerous metabolic pathways including those responsible for its assimilation from the environment. The principal phosphorus source that is readily available to bacteria is inorganic phosphate ions. The physiological responses to phosphate starvation have been investigated in detail in some bacteria, and generally involve the induction of a set of genes whose products allow a better phosphate uptake or phosphorus supply through other environmental sources. In *E. coli*, a number of phosphate starvation genes, such as *phoA* (encoding alkaline phosphatase), are under the control of the Pho regulon [36] and are induced about 100-fold upon Pi limitation. To monitor this genetically-programmed response, the *phoA* promoter of *E. coli* was fused to the structural

Contaminant	References
Arsenic	[9, 10]
Benzene derivatives	[11]
Heavy metals	[12-14]
Mercury	[15]
Middle chain alkanes	[16]
Nitrates	[17]
Naphthalene/Salicylate	[18]
Tetracyclines	[19]
Toxicants, genotoxics	[20-24]
Tributyl tin	[25]
UV radiation	[26]

Table 1. Selected gene fusion clones for the detection of chemicals (for reviews, see also ref. [27-33])

luxCDABE operon from *Vibrio fischeri* in the plasmid pUCD615 [37]. The recombinant plasmid was then introduced into *E. coli* and transformants were tested for their ability to report phosphate availability via light emission.

In the assay, exponentially growing cells cultured in a rich Pi medium are shifted to decreasing concentrations of Pi, and light emission is measured versus time. The response is rapid, with increased light emission within 15 min after the exhaustion of Pi, and proportional to decreasing concentrations of available Pi, in the range of 500 μM to 5 μM (Fig 1). Maximum induction (about 90x the minimal level) occurs after 1h incubation. A clear dose-response is also evident when other phosphorus sources (polyphosphates, organophosphates) are assayed (not shown). However, in all cases, induction occurs at higher concentrations when compared to Pi, indicating that this bacterial biosensor primarily reports Pi bioavailability.

2) Bacterial biosensors for the detection of heavy metals.

The accumulation of heavy metals in the environment, as a result of their wide use in industrial processes, has created various public health hazards and ecological perturbations. Among metal ions, trace elements (including zinc, cobalt, nickel and copper) are essential for most organisms, performing catalytic or structural functions in enzymes implicated in a number of cellular processes. However, all metals are toxic in excess and, as a consequence, cells have evolved mechanisms for the maintenance of suitable metal ion homeostasis.

By screening a *lux*-transcriptional fusion library of *E. coli*, [38] our laboratory has previously identified unknown genes whose expression is induced in the presence of toxic metals and metalloids, tributyltin, and arsenic and antimony oxyanions (for a review, see ref. [39]). More

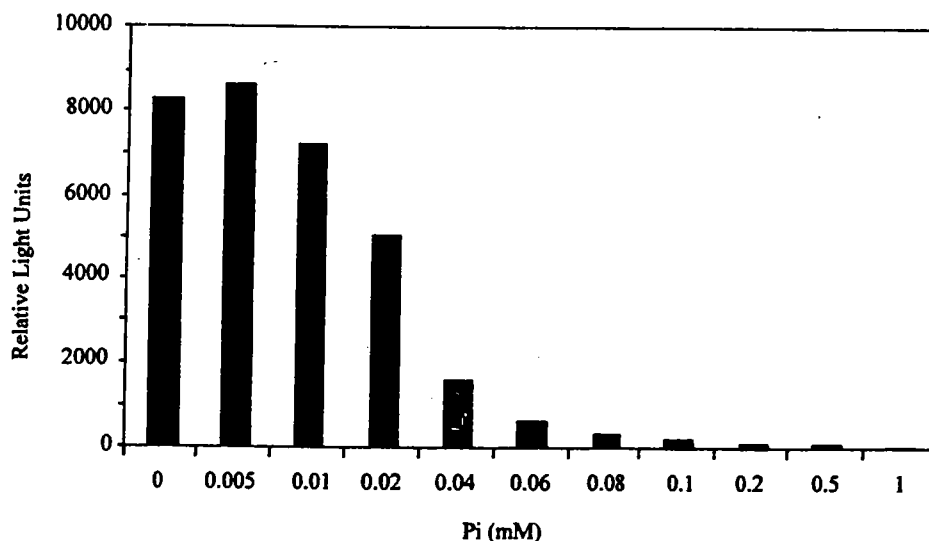


Fig 1.: Induction of light emission of an *E. coli* strain bearing a *phoA::lux* fusion in response to Pi availability. Luminescence was measured after 1h incubation of exponentially growing cells in minimal MOPS medium supplemented with the indicated amounts of Pi.

recently, we screened a similar *lacZ* transcriptional fusion library and isolated the *zntA* gene as a mercury-regulated gene. This gene encodes an integral membrane protein of the CPx-type ATPase family [40] that has recently been shown to be responsible for the export of zinc, cadmium and lead ions from the cells [41, 42], and consequently, ZntA increases tolerance of *E. coli* to excess levels of these heavy metals. We found that expression of a chromosomal *zntA::lacZ* fusion, was induced by several non-essential heavy metals, including Hg, Pb, Cd and, to a weaker extent by Zn. Other metal ions or organometallic compounds were not found to induce this gene fusion. The transcriptional regulation of *zntA* is mediated by the *zntR* gene product, a member of the MerR family (mercury resistance operon) of

transcriptional regulators which appear to act as a hypersensitive transcriptional switch [43].

We used these characteristics of *zntA* gene regulation to create a luminescent reporter system for the detection of inducing metals. A 137 bp DNA fragment containing the promoter/operator region of *zntA* has been obtained by PCR and cloned into the reporter plasmid pUCD615 [37] to create pZNT::lux. As the expression of the *lux* genes is under the control of the *zntA* regulation system, the new plasmid, pZNT::lux, confers light emission upon cellular exposure to heavy metal cations, such as Cd(II), Hg(II), Pb(II) and Zn(II).

Different *E. coli* strains containing pZNT::lux have been assayed for luminescence under various conditions. Optimum results in sensitivity and induction rates could be obtained by the use of *E.*

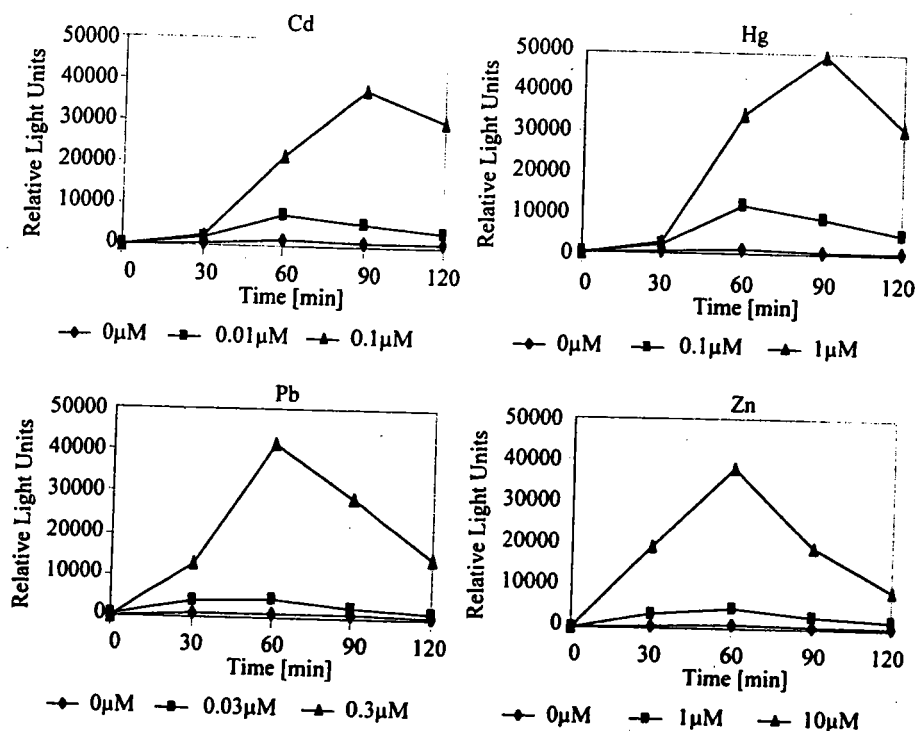


Fig. 2: Time course of light induction of *E. coli*/pZNT::lux in response to Cd(II), Hg(II), Zn(II), and Pb(II). Exponentially growing cells were incubated in GGM medium supplemented with the indicated metal concentrations (Riether *et al.*, in preparation).

coli/pZNT::lux grown in glycerol-glycerophosphate medium (GGM), a medium containing no organic phosphates to prevent heavy metal precipitation [44]. Maximal induction is obtained after 1 hour of incubation (Fig. 2). This *zntA-lux* fusion is responsive to Cd(II) in the 0.01-1 μ M concentration range, to Hg(II) from 0.03-3 μ M, to Pb(II) from 0.03-100 μ M and to Zn(II) in the 1-10 μ M concentration range. At higher concentrations of these compounds, light induction diminishes because of toxicity (not shown). One fundamental argument for the use of such a biosensor is the rapidity of environmental assessment and its direct application *in situ* with soil samples. The described reporter strain was tested when added to artificially contaminated soil samples (Fig. 3). A concentration-dependent light emission could also be observed (not shown).

From these results, we conclude that this

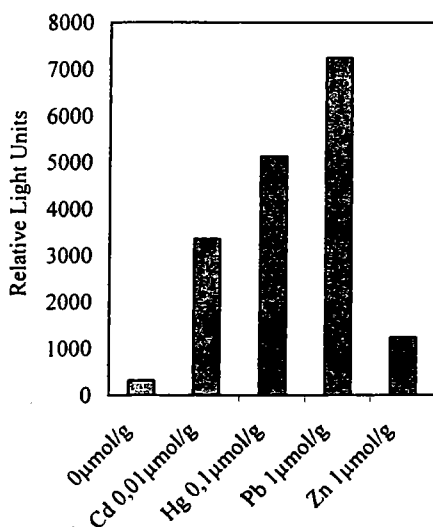


Fig. 3: Light emission patterns of *E. coli/pZNT::lux* in the presence of metal-contaminated soil samples. 100 μ l of an exponentially growing culture was exposed to 10 mg of soil samples artificially contaminated with the indicated metal concentrations. Light emission was measured after 60 min incubation.

biosensor can serve as an efficient tool to assess bioavailable heavy metal amounts in both liquid and soil samples (Riether *et al.*, in preparation).

CONCLUSIONS

The described biosensor techniques present new perspectives in environmental monitoring and analysis. The gene fusions in bacteria have convenient properties for the detection of bioavailable amounts of a large variety of chemicals (see Table 1). The use of a battery of microtests containing different bacterial reporter strains in microplates can give a detailed assessment for the contamination of water, soil, or sludge samples. As these assays are easy, rapid and inexpensive, they can be an interesting and important analytical tool in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

The development of the *phoP::lux* construction was supported by NAN.C.I.E. and CIRSEE - Lyonnaise des Eaux. Thanks to Marie-Andr e DOLLARD and Nathalie BABIC for technical assistance. Karl B. RIETHER is a grant holder of the European Commission (BIO 4-98-5068).

REFERENCES

1. Loper, J.E., and Lindow, S.E. 1997, Manual of Environmental Microbiology, C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach and M.V. Walter (Eds.), ASM Press, Washington, 482.
2. Burlage, R.S., 1997, Manual of Environmental Microbiology, C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach and M.V. Walter (Eds.), ASM press, Washington, 115.
3. Naylor, L.H. 1999, Biochem. Pharmacol., 58, 749.
4. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. 1994, Science, 263, 802.
5. Errampalli, D., Leung, K., Cassidy, M.B., Kostrzynska, M., Blears, M., Lee, H., and Trevors, J.T. 1999, J. Microbiol. Methods, 35, 187.
6. Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., and Molin, S. 1998, Appl. Environ. Microbiol., 64, 2240.
7. Tsien, R.Y. 1998, Annu. Rev. Biochem., 67, 509.
8. Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., Hofnung,

- M. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5971.
9. Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., DuBow, M.S. 1995, J. Bacteriol., 177, 2050
10. Cai, J., and DuBow, M.S. 1997, Biodegradation, 8, 105.
11. Kobatake, E., Niimi, T., Haruyama, T., Ikariyama, Y., and Aizawa, M. 1995, Biosens. Bioelectron., 10, 601.
12. Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., and Virta, M. 1998, Biosens. Bioelectron., 13, 931.
13. Corbisier, P. 1997, Res. Microbiol., 48, 534.
14. Guzzo, A., and DuBow, M.S. 1994, FEMS Microbiol. Rev., 14, 369.
15. Selifonova, O., Burlage, R., and Barkay T. 1993, Appl. Environ. Microbiol., 59, 3083.
16. Sticher, P., Jaspers, M.C., Stemmler, K., Harms, H., Zehnder, A.J., and van der Meer, J.R. 1997, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4053.
17. Prest, A.G., Winson, M.K., Hammond, J.R., and Stewart, G.S. 1997, Lett. Appl. Microbiol., 24, 355.
18. Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J.E., Bienkowski, P.R., White, D.C., and Sayler, G.S. 1994, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1487.
19. Korpela, M.T., Kurittu, J.S., Karvinen, J.T., and Karp, M.T. 1998, Anal. Chem., 70, 4457.
20. Ptitsyn, L.R., Horneck, G., Komova, O., Kozubek, S., Krasavin, E.A., Bonev, M., and Rettberg P. 1997, Appl. Environ. Microbiol., 63, 4377.
21. Van Dyk, T.K., Majarian, W.R., Konstantinov, K.B., Young, R.M., Dhurjati, P.S., and LaRossa, R.A. 1994, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1414.
22. Ben-Israel, O., Ben-Israel, H., and Ulitzur, S. 1998, Appl. Environ. Microbiol., 64, 4346.
23. Vollmer, A.C., Belkin, S., Smulski, D.R., Van Dyk, T.K., and LaRossa, R.A. 1997, Appl. Environ. Microbiol., 63, 2566.
24. Billinton, N., Barker, M.G., Michel, C.E., Knight, A.W., Heyer, W.D., Goddard, N.J., Fielden, P.R., and Walmsley, R.M. 1998, Biosens. Bioelectron., 13, 831.
25. Briscoe, S.F., Diorio, C., DuBow, M.S. 1996, Environmental Biotechnology: Principles and Applications, M. Moo-Young, W.A. Anderson and A.M. Chakrabarty, (Eds.) Kluwer Academic Publishers, 645.
26. Elasri, M.O., and Miller, R.V. 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 455.
27. Vollmer, A.C. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 145.
28. Burlage, R.S. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 259.
29. Costanzo, M.A., Guzzo, J., DuBow, M.S. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 201.
30. Virta, M., Tauriainen, S., and Karp, M. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 219.
31. Barkay, T., Turner, R.R., Rasmussen, L.D., Kelly, C.A., and Rudd, J.W. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 231.
32. Belkin, S. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 247
33. Billard, P., and DuBow, M.S. 1998, Clin. Biochem., 31, 1.
34. Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Vartiainen, T., and Martikainen, P.J. 1999, Appl. Environ. Microbiol., 65, 2032.
35. Nakamura, H., Ikebukuro, K., McNiven, S., Karube, I., Yamamoto, H., Hayashi, K., Suzuki, M., and Kubo, I. 1997, Biosens. Bioelectron., 12, 959.
36. Wanner, B. 1996, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* - Cellular and molecular biology, F.C. Neidhardt (Ed.), ASM Press, Washington, 1357.
37. Rogowski, P.M., Close, T.J., Chimera, J.A., Shaw, J.J., and Kado, C.I. 1987, J. Bact., 169, 5101.
38. Alexander D.C., and DuBow, M.S. 1998, Methods Mol. Biol., 102, 105.
39. DuBow M.S., 1998, Ann. N. Y. Acad. Sci., 851, 286.
40. Solioz, M., and Vulpe, C. 1996, Trends Biochem. Sci., 21, 237.
41. Beard, S.J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M.N., and Poole, R.K. 1997, Mol. Microbiol., 25, 883.
42. Rensing, C., Mitra, B., and Rosen, B.P. 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14326.
43. Brocklehurst, K.R., Hobman, J.L., Lawley, B., Marshall, S.J., Brown, N.L., Morby A.P. 1999, Mol. Microbiol., 31, 893.
44. Poole, R.K., Williams, H.D., Downie, J.A., Gibson, F. 1989, J. Gen. Microbiol., 135, 1865.

RESUME**Développement d'un biocapteur bactérien pour la détection de métaux lourds**

A l'issue du criblage d'une banque de fusions transcriptionnelles avec le gène *lacZ* d'*Escherichia coli*, un gène dont l'expression est induite par la présence de mercure a été isolé. Ce gène, nommé *zntA*, code pour une ATPase de type P, qui transporte des métaux lourds (cadmium, plomb zinc) vers l'extérieur de la cellule, et constitue donc un système de résistance vis-à-vis de ces composés. Nous avons pu observer que l'expression de la fusion *zntA::lacZ* est induite en présence de composés inorganiques de cadmium, de mercure, de plomb et de zinc, et que cette réponse est dose-dépendante.

Afin de créer une souche rapporteur luminescente, le promoteur de *zntA* a été amplifié par PCR et cloné dans le plasmide pUCD615, en amont des gènes rapporteurs *luxCDABE* de *Vibrio fischeri*. Le plasmide résultant, pZNT::lux, confère la production de lumière à différentes souches d'*E. coli*, lorsque les cellules sont exposées aux métaux lourds. A l'aide de la souche rapporteur obtenue, nous avons développé un procédé de mesure luminométrique permettant la détection de métaux lourds. Les conditions de mesure ont été optimisées en modification de paramètres tels que le milieu de culture, la phase de culture bactérienne, la densité cellulaire et le pH afin d'obtenir un protocole de mesure rapide et sensible. Le bioessai permet la détection de cadmium, de mercure, de plomb et de zinc à partir de concentrations respectives de 0,01 μM , 0,1 μM , 0,03 μM et 0,3 μM .

L'intérêt principal de l'approche est qu'elle permet d'évaluer la fraction biodisponible de métaux lourds, même dans des matrices complexes tels que des sols contaminés et leurs lixiviats. Malgré le fait que de nombreux facteurs environnementaux peuvent influencer la réponse luminescente et qu'il est difficile de distinguer les proportions relatives de différents métaux inducteurs dans un mélange, cette technique analytique peut constituer un outil précieux pour une mesure semi-quantitative de la présence de métaux lourds dans des échantillons naturels.

Mots clés : *Escherichia coli*, métaux lourds, biocapteur, fusion transcriptionnelle, gène rapporteur, bioluminescence

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF A BACTERIAL BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF HEAVY METALS**

By screening a library of *lacZ* transcriptional gene fusions in *Escherichia coli* on HgCl_2 , a gene whose expression was found to be mercury-inducible was isolated. This gene, named *zntA*, encodes a metal translocating P-type ATPase conferring resistance of *E. coli* to cadmium, lead and zinc by extrusion. By measuring *zntA::lacZ* gene expression, we have shown that this fusion is responsive to the presence of inorganic compounds of cadmium, mercury, lead and zinc in a dose-dependant manner.

A *zntA*-based reporter plasmid has been constructed by insertion of the PCR synthesized promotor sequence of *zntA* into the plasmid vector containing the *luxCDABE* genes encoding bacterial luciferase of *Vibrio fischeri*. The resulting plasmid, pZNT::lux, conferred light production to different *E. coli* strains upon exposure to heavy metals. The obtained reporter strain was used to develop a whole cell biosensor system for the detection of heavy metals by measuring light emission. The test conditions have been optimised by the modification of parameters such as culture medium, bacterial growth phase, cell density and pH, and the resulting protocol allowed the rapid detection of cadmium, mercury, lead and zinc from thresholds of 0,01 μM , 0,1 μM , 0,03 μM and 0,3 μM respectively.

The main interest of this analytical tool is the evaluation of bioavailable heavy metal content in an environmental sample. Preliminary probing for bioavailable heavy metals in complex matrixes such as soils and their leachates was succesful. Though various environmental factors may influence the luminescence response, and the presence of different heavy metals may not be distinguished, this technique presents an interesting analytical tool for a semi-quantitative measure of heavy metals in environmental samples.

Key Words: *Escherichia coli*, heavy metals, biosensor, transcriptional fusion, reporter gene, bioluminescence