



HAL
open science

Conception de biosenseurs fluorescents multicolores pour l'identification in vivo des interactions bio-physicochimiques dans les systèmes minéral-bactérie

Damien Parrello

► To cite this version:

Damien Parrello. Conception de biosenseurs fluorescents multicolores pour l'identification in vivo des interactions bio-physicochimiques dans les systèmes minéral-bactérie. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0362 . tel-01751812

HAL Id: tel-01751812

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751812>

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>

Conception de biosenseurs fluorescents multicolores pour l'identification *in vivo* des interactions bio-physico-chimiques dans les systèmes minéral-bactérie

Damien PARRELLO

Thèse de l'Université de Lorraine
Spécialité Géosciences

Soutenue publiquement, le 5 décembre 2014

Composition du Jury

Rapporteurs : Marie Libert, Chargée de recherche HDR, CEA-LMTE Cadarache
Gérald Thouand, Professeur des Universités, Université de Nantes

Examineurs : Valérie Goeffroy, Maître de Conférences HDR, Université de Strasbourg
Bernard Humbert, Professeur des Universités, Université de Nantes
Jean-Claude Block, Professeur des Universités, Université de Lorraine

Directeurs : Patrick Billard, Maître de Conférences, Université de Lorraine
Christian Mustin, Directeur de Recherche, CNRS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, Dr. Mustin Christian et Dr. Billard Patrick, pour l'importante liberté intellectuelle dont j'ai pu jouir durant mon doctorat.

Je remercie ensuite les membres de mon jury de thèse, Dr. Libert Marie et Dr. Thouand Gérald en leur qualité de rapporteurs, ainsi que Dr. Humbert Bernard, Dr. Block Jean-Claude et Dr. Geoffroy Valérie en leur qualité d'examineurs, pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour leurs remarques constructives visant à améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je remercie également l'ex-directrice adjointe du LIEC (ex-directrice du LIMOS), Dr. Leyval Corinne, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier Dr. Zegeye Asfaw pour s'être toujours montré présent et m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Plus qu'un simple collègue, je suis heureux de le compter parmi mes amis.

Enfin,

Je ne serai jamais assez reconnaissant envers ma famille,

A Maud, mon âme sœur, mon amour, qui n'a pas douté une seule fois. Le monde nous attend.

A mes parents, sans lesquelles tout ceci n'aurait jamais été possible.

Avant-Propos

Ce travail a été soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) au travers du projet HÆSPRI "Hyperspectral Analysis and Enhanced Surface Probing of Representative bacteria-mineral Interaction" (Projet ANR- 09-BLAN-0336 - Programme Blanc 2009-2014, coordonné par le LIEC)

Le projet HÆSPRI avait pour objectifs : (1) d'étudier le fonctionnement de Systèmes Minéral-Bactérie (SMB) modèles par l'analyse de signaux spectroscopiques pertinents utilisables *in vivo* et *in situ* (Raman, Fluorescence, Luminescence, SHG...) et/ou par l'utilisation de biosenseurs à cellules entières .

- explorer les possibilités de développement une méthode générale, combinant ingénierie moléculaire, analyses spectroscopiques pour identifier les interactions et les réponses fonctionnelles dans des SMB particuliers.

Le présent travail s'inscrit dans les deux axes cités, d'une part par le développement de biosenseurs multicolores et l'utilisation optimisée de la spectroscopie de fluorescence à balayage synchrone, et d'autre part, par l'apport d'une méthode d'analyse multilinéaire sans *a priori* pour identifier et estimer les réponses fonctionnelles de ces biosenseurs dans des environnements minéraux.

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	6
Introduction	9
1. Les biosenseurs.....	10
2. Les transducteurs.....	12
2.1. <i>Transducteurs électriques</i>	12
2.2. <i>Transducteurs conductimétriques</i>	12
2.3. <i>Transducteurs calorimétriques</i>	13
2.4. <i>Transducteurs optiques</i>	13
3. Les éléments sensibles.....	13
3.1. <i>Les biosenseurs d'affinité</i>	13
3.2. <i>Les biosenseurs catalytiques</i>	13
3.3. <i>Les biosenseurs catalytiques à cellules entières</i>	14
4. Les biosenseurs bactériens à cellule entière	14
4.1. <i>Biosenseurs à détection électrochimique</i>	14
4.1. <i>Biosenseurs à détection optique</i>	16
5. Les biosenseurs bactériens environnementaux	17
6. Problématiques actuelles	20
6.1. <i>Les apports potentiels de la biologie synthétique</i>	22
6.2. <i>Les apports potentiels de la biologie des systèmes</i>	25
7. Orientation et objectifs du travail de thèse.....	27
<i>Bibliographie</i>	29
Matériel et Méthodes	37
1. Souches bactériennes hôtes et construction des biosenseurs	37
1.1. <i>Souches bactériennes</i>	38
1.2. <i>Vecteurs plasmidiques</i>	38
1.3. <i>Techniques générales de biologie moléculaire</i>	40
2. Les substrats minéraux : les colloïdes de Nontronite	42
2.1. <i>Structure cristallographique de N_{Au}-1 et N_{Au}-2</i>	43
2.2. <i>Les suspensions colloïdales de nontronite</i>	44
3. Synthèse des gels de silice hybride	45
3.1. <i>Les étapes de synthèse</i>	46
3.2. <i>Synthèse des GSH robotisée</i>	47
4. Milieux de culture	49
4.1. <i>Le milieu LB (lysogeny broth)</i>	49
4.2. <i>Le milieu DCAA (Deferrated CasAmino Acid)</i>	50
4.3. <i>Le milieu minimal MOPS</i>	50
5. Les dispositifs d'incubation.....	51
6. Dosage des éléments et substances en solution	51
6.1. <i>Mesure de la concentration en fer en solution</i>	52
6.2. <i>Mesure de la concentration en fer adsorbé ou précipité</i>	52
6.3. <i>Détermination des métabolites produits</i>	53

7.	Mesures spectrométriques de fluorescence	53
7.1.	<i>La spectrométrie de fluorescence</i>	54
7.2.	<i>La spectrométrie optique sur gel de silice hybride</i>	55
8.	Les plans d'expériences pour la production de données tri-linéaires	55
9.	Recherche de gènes sensibles aux textures minérales.....	56
9.1.	<i>Collection de promoteurs d'Escherichia coli K12 (Zaslaver et al. 2006)</i>	57
9.2.	<i>Criblage de la collection : recherche de promoteurs mineral-sensitive</i>	58
9.3.	<i>Classification des réponses</i>	59
	<i>Bibliographie</i>	60

Chapitre 1 : Approche multilinéaire pour l'estimation de la réponse de biosenseurs fluorescents au fer (III) 63

1.	Construction de biosenseurs multicolores	64
1.1.	<i>Les protéines fluorescentes utilisées</i>	64
1.2.	<i>Les vecteurs utilisés</i>	65
2.	Analyse multidimensionnelle de mélange de signaux fluorescents	66
2.1.	<i>Données multidimensionnelles et tenseurs</i>	67
2.2.	<i>Modèle CANDECOMP/PARAFAC (CP)</i>	68
2.3.	<i>Avantages de la méthode CP pour une analyse systémique via des biosenseurs</i>	70
3.	La spectroscopie de fluorescence : apport de la mesure synchrone	71
3.1.	<i>Spectre d'émission et d'excitation</i>	71
3.2.	<i>Les matrices d'excitation et d'émission</i>	72
3.3.	<i>Mesure synchrone</i>	73
4.	Estimation de la réponse de biosenseurs par le couplage Fluorescence/CP	76
4.1.	<i>Résumé des articles présentés</i>	77
	<i>Bibliographie</i>	78
	<i>Article 1</i>	81
	<i>Article 2</i>	93

Chapitre 2 : Altération bactérienne des nontronites : Cristallochimie versus biochimie .. 115

1.	Fer, métaux et métabolisme microbien.....	117
2.	Rôle des métabolites acides et des sidérophores dans l'altération minérale	119
2.1.	<i>Les agents d'oxydo-réduction</i>	119
2.2.	<i>Les bioréactifs acido-complexants</i>	121
2.3.	<i>Des métabolites particuliers : les sidérophores</i>	122
3.	Transformations minéralogiques bioinduites des nontronites au sein des GSH	124
3.1.	<i>La dissolution réductive des nontronites</i>	125
3.2.	<i>L'acido-complexolyse des nontronites</i>	126
4.	Expériences préliminaires : Interactions PAO1/Nontronite	127
4.1.	<i>Production d'acides organiques et de sidérophores en présence de gels dopés en nontronites</i>	127
4.2.	<i>Importance de la structure chimique de la nontronite sur sa réactivité</i>	130
5.	Application de la méthode CP au système N Au-2/NAu-1/PAO1	131
5.1.	<i>Mélange N Au-1/NAu-2 et altération chimique</i>	131
5.2.	<i>Altération biotique (PAO1) sur des mélanges de nontronite N Au-1-NAu-2 (Article 3)</i>	133
	<i>Bibliographie</i>	134
	<i>Article 3</i>	141

Chapitre 3 : Recherche de gènes « minéral-sensitive » – Approche multiparamétrique par criblage de banques 155

1. Séquençage haut-débit et transcriptomique vs. criblage de banques	156
1.1. Les méthodes en vogue.....	156
1.2. Le choix du criblage chez <i>E. coli</i> K12 MG1655	158
2. Criblage de la collection de promoteurs chez <i>E. coli</i> K12 MG1655	158
3. Pré-traitements des données brutes	159
3.1. Prise en compte de l'écrantage.....	159
3.2. Seuillage du bruit de fond.....	161
4. Analyse de l'expression différentielle des promoteurs	161
4.1. Classification de l'expression des promoteurs avec la méthode « <i>k-means</i> ».....	162
5. Evaluation des biais méthodologiques sur les promoteurs sélectionnés	166
6. Conclusion	168
Bibliographie	169

Synthèse et Discussion - Des approches systémiques multiparamétriques à la biologie synthétique..... 171

1. Les approches multilinéaires avec des biosenseurs fluorescents.....	171
1.1. Forces de la méthode.....	171
1.2. Les limites technologiques et instrumentales	172
1.3. Les limites biologiques	173
1.4. Les contraintes systémiques	174
1.5. Les contraintes algébriques et mathématiques.....	174
2. Perspectives.....	175
2.1. Les modèles à n dimensions ($n > 3$)	175
2.2. Les approches « environnementales » non destructives et non invasives	176
3. Une ébauche de biosensing environnemental	176
4. Vers l'étude des systèmes complexes vus comme un tout	178
Bibliographie	181

Annexes 183

Annexe I : Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels	185
Annexe II : Multicolor Whole-Cell Bacterial Sensing Using a Synchronous Fluorescence Spectroscopy-Based Approach	197
Annexe III : Visualisation de l'expression cellulaire des promoteurs <i>rrnC</i> , <i>rpsJ</i> et <i>yfhL</i> chez <i>E. coli</i> K12 MG1655 (« single cell approach »).....	214
Annexe IV : Liste et caractéristiques des 132 promoteurs « mineral responsive » sélectionnés par criblage sur microplaques	227

Liste des abréviations

ACP	: Analyse en Composantes Principales
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
Ap ^r	: Résistance à l'ampiciline
ARN	: Acide RiboNucléique
ARN ^r	: Acide RiboNucléique ribosomique
ATP	: Adénosine-5'-Triphosphate
BHm	: Bushnell-Haas modifié (milieu de culture)
BTEX	: Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylènes (ortho, méta, para)
BW	: Band-Width - Bande Passante
CP	: Canonical Polyadic (CP) decomposition ou Candecomp/Parafac
DCAA	: Milieu Casamino-Acid sans fer (Depleted CasAmino Acid)
DVS	: Décomposition en valeur singulière
FAAS	: Flame Atomic Absorption Spectroscopy
FDA	: Food and Drug Administration
FP	: Protéine auto-fluorescente (type GFP, E2_orange...)
GFAAS	: Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy
GFP	: Protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)
Gm ^r	: Résistance à la gentamycine
GOx	: Glucose-oxydase
GPI	: Glycosylphosphatidylinositol,
GS	: Gel de Silice pur
GSH	: Gel de silice Hybride
GSH-NAux	: Gel de silice dopé en colloïdes de Nontronite (NAu-1 ou NAu-2)
HAP	: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
ICP-AES	: Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy
ICP-MS	: Inductively Coupled Plasma - Mass Spectroscopy
iGEM	: International Genetically Engineered Machine
INP	: Ice Nucleation Protein, protéine d'encrage membranaire
IR	: Infrarouge

Km ^r	: Résistance à la kanamycine
LB	: milieu de culture Lysogenic Broth ou de Luria-Bertani
MEEF	: Matrice d'Excitation et d'Emission de Fluorescence
MIT	: Massachusetts Institute of Technology
MOPS	: Milieu de culture minimum contenant du tampon MOPS [3-(N-Morpholino)propanesulfonique acide]
MP	: MicroPlate
NAD ⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide
NAu-x	: Nontronite de Uley , NAu-1 ou NAu-2
OP	: composé OrganoPhosphoré
PALM	: Photoactivated Localization Microscopy
PCR	: Réaction en chaîne par polymérase
PM	: Photomultiplicateur
PNP	: <i>p</i> -nitrophénol
PP	: Polypropylène
<i>ppp::rrr</i>	: désigne la fusion entre un gène promoteur (<i>ppp</i>) et un gène rapporteur (<i>rrr</i>) codant une protéine fluorescente (e.g. <i>bfrB::mcherry</i>).
RBS	: Site de fixation du ribosome (ribosome binding site)
RFP	: Red Fluorescent Protein
SAXS	: Diffusion des rayons X aux petits angles (Small-Angle X-ray Scattering)
SFS	: Spectroscopie de Fluorescence Synchrone
Tc ^r	: Résistance à la tétracycline
TEOS	: Tétraoéthoxysilane
TNT	: Trinitrotoluène
UV-vis	: Ultra-violet visible
XRF	: X-Ray Fluorescence Spectrometry
YFP	: Yellow Fluorescent Protein
YSI	: Yellow Spring Instrument

Introduction

Aujourd'hui, parmi les principaux défis techniques et scientifiques dans le domaine de l'environnement, l'évaluation de la qualité et du fonctionnement des écosystèmes terrestres occupe une place centrale. La mise en place de système d'observation ou procédés de restauration de la qualité des milieux (sols, eaux ...) passe obligatoirement par une meilleure compréhension des interactions entre les microorganismes, les métaux et les minéraux, dans ces environnements naturels qu'ils soient préservés ou fortement détériorés et perturbés par les activités humaines. Pour être efficaces, ces systèmes de surveillance exigent des techniques d'analyse et de mesures robustes de la disponibilité chimique et biologique de certains éléments essentiels et nutriments (Fe, Mg, P, K, C, N...) ou de contaminants organiques (HAP) ou de métalliques (Cd, Pb, Hg...). Par exemple, l'évaluation de la spéciation et de la disponibilité du fer ainsi que l'identification des processus d'oxydo-réduction ou d'altération minérale associés constituent d'excellents indicateurs chimiques ou biologiques de la fertilité des sols (Lindsay & Schwab, 1982 ; Marschner, 1995 ; Fredrickson and Gorby, 1996). De même, une détection précoce, rapide et efficace des substances potentiellement toxiques pour les êtres vivants (métaux lourds, hydrocarbures aromatiques, pesticides halogénés, nanoparticules ...) faciliterait le déploiement de mesures de surveillance ou de stratégies de restauration des milieux contaminés et fortement anthropisés. Ainsi l'évaluation robuste de la biodisponibilité d'une substance, i.e. pouvant interagir avec les organismes vivants à un instant donné, est donc un enjeu essentiel dans de nombreuses problématiques environnementales, quel que soit le milieu cible considéré : eau, sol, sédiment...

Déjà développés et utilisés depuis de nombreuses années, des tests de biodisponibilité et de toxicité utilisant des organismes vivants permettent d'estimer l'exposition réelle des populations végétales et animales aux polluants. Ces mesures écotoxicologiques sont très utiles pour l'évaluation des risques et pour la sélection des options d'assainissement appropriées (Liao *et al.* 2006). Ainsi dans la dernière décennie, de nombreux biosenseurs ont été mis au point pour la détection de polluants disponibles dans l'eau à des niveaux voisins de leur seuil de toxicité ou présentant un risque d'intoxication chronique sur le long terme. Par exemple, Selifonova *et al.* (1993) et Rasmussen *et al.* (2000) ont construit, à partir de la souche bactérienne *Escherichia coli*, un biosenseur capable de détecter du mercure Hg²⁺ à des concentrations extrêmement basses, de l'ordre du dixième de nano-mole. A l'aide de constructions génétiques similaires, les fractions (bio)-disponibles de métaux toxiques comme l'arsenic, l'antimoine, le cadmium, le zinc ou encore le plomb peuvent être détectés à des concentrations allant de la nano-mole à la micromole. Les études sur les processus de (bio)-dégradation de polluants aromatiques, tels que les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène) ont également stimulé le développement de biosenseurs bactériens. Ainsi, le benzène, le toluène ou le xylène peuvent être détectés via la souche *E. coli* à des concentrations de l'ordre du µM. Aujourd'hui, des dizaines de souches bactériennes ont été ingénierées pour la détection de composés toxiques tels que des génotoxiques ou des radicaux libres (Tableau 2 & Tableau 5).

Tous ces biosenseurs exploitent des mécanismes cellulaires assurant la transformation, la séquestration ou l'expulsion sélective et contrôlée des composés en fonction de leur caractère

essentiel ou toxique. Or, comme le montre l'étude de la toxicité de certains métaux lourds (Cr, As...), c'est autant la spéciation et la biodisponibilité des éléments résultant des différents processus de transformation dans l'environnement que leur concentration totale qui déterminent les effets physiologiques et toxiques sur les systèmes biologiques (Rensing et Maier, 2003). L'écart entre la quantité totale et la fraction biodisponible (i.e. susceptible d'interagir avec les êtres vivants) peut être importante, surtout dans le cas des contaminants avec de faibles constantes de dissociation ou de faible solubilité aqueuse (Tecon et van der Meer, 2008). Sans oublier les effets « cocktail » générés par la présence de stress multiples qui peuvent ôter toute linéarité aux réponses et réduire le champ d'application des biosenseurs. Une connaissance précise du fonctionnement de ces systèmes cellulaires inductibles par les polluants ("polluant-responsive") et de leur réponse multiparamétrique doit donc non seulement servir à concevoir des nouveaux biosenseurs, mais à générer des stratégies d'usage des senseurs.

Ainsi, à côté des capteurs conventionnels (sondes pH, conductimétrique, hygrométrique,...) et des biosenseurs classiques à enzymes ou protéines immobilisées (électrode de Clarke), les chercheurs développent des biosenseurs à cellules entières plus ou moins spécifiques capables de détecter et de doser, voire de localiser, directement les métaux in situ. En insérant de façon appropriée des systèmes rapporteurs luminescents ou fluorescents, ces (micro-)organismes génétiquement modifiés produisent un signal quantifiable dont l'intensité est souvent dose-dépendante.

1. Les biosenseurs

Un biosenseur est un outil d'analyse qualitative ou quantitative permettant de détecter la présence ou d'estimer la concentration d'éléments chimiques ou molécules par le biais d'un élément sensible d'origine biologique. En dehors de tout façonnage ou design spécifique, la composition de ce système de reconnaissance biologique est variable. Il peut s'agir de molécules actives comme des enzymes purifiées, des anticorps monoclonaux, des acides nucléiques (e.g. aptamères) ou de cellules entières immobilisées d'organismes procaryotes ou eucaryotes. L'histoire de cette biotechnologie débuta en 1962 par les travaux de Leyland C. Clark, biochimiste américain, inventeur d'une sonde polarographique capable de mesurer le taux d'oxygène dissous dans une solution aqueuse (Electrode de Clark, 1956). L'élément sensible de cette sonde ampérométrique est constitué d'un couple d'électrodes platine-argent (cathode-anode) plongeant dans un électrolyte (e.g. KCl concentré) et séparés de l'analyte par une membrane en Téflon perméable au gaz dissous. Sous un faible potentiel de polarisation, le dioxygène est ionisé en ions hydroxyles à la cathode, alors qu'à l'anode, l'argent est oxydé. Il en résulte un très faible courant induit, dont l'intensité est proportionnelle au logarithme de la concentration en oxygène dissous dans l'électrolyte. Clark eut l'idée de généraliser le principe de détection ampérométrique à d'autres sondes composées de réactifs immobilisés électro-actifs, comme les enzymes catalysant des réactions d'oxydo-réduction. Ces enzymes électro-actives sont bien adaptées à la détermination de l'activité de molécules organiques non électrochimiquement actives. En raison de leur forte sélectivité, l'utilisation d'enzymes purifiées autorise la détection fiable d'un large éventail de molécules à très faible concentration.

La première électrode sélective à enzymes immobilisées fût conçue par Clark pour détecter l'activité du glucose en solution aqueuse. L'électrode fonctionnelle est constituée d'une fine couche de glucose-oxydase (GOx), immobilisée entre une membrane de dialyse au contact l'électrode de platine afin de détecter la présence de glucose par ampérométrie (Wang, 2001). L'enzyme GOx catalyse la formation de l'acide gluconique par l'oxydation du β -D-glucose en consommant une molécule de dioxygène. Le courant induit est ici directement proportionnel à la concentration en glucose du milieu. En 1975, la société Yellow Spring Instrument (YSI) dérivait la technologie de Clark en détectant non pas la consommation d'oxygène mais la production de peroxyde d'hydrogène par une autre enzyme et lança le premier biosenseur commercial (modèle 23A YSI analyzer). Cette technique simple et rapide donne le taux de glucose dans des petits échantillons de sang (25 μ l) (Wang, 2008). Plusieurs décennies plus tard, des millions de

diabétiques peuvent ainsi suivre quotidiennement et sans difficulté leur taux de glucose sanguin dans une goutte de sang, grâce à des biosenseurs miniaturisés et portatifs. Considéré comme le « père des biosenseurs », les travaux pionniers de Leland C. Clark ont inspiré le développement d'une multitude de biosenseurs qui seront détaillée plus loin.

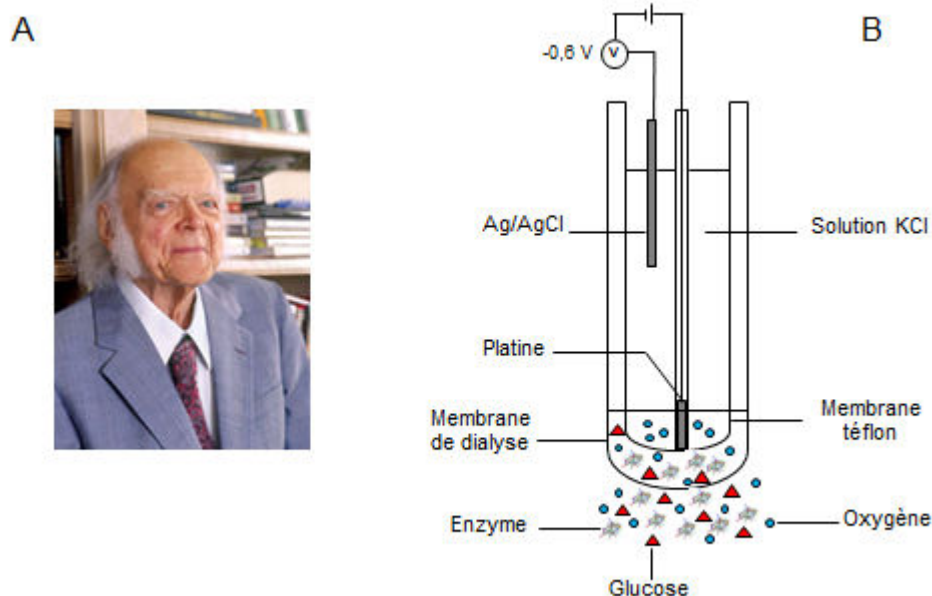


Figure 1 : A- Leland C. Clark Jr. (1918–2005); B- Schéma de l'électrode à enzymes immobilisées de Clark. Les enzymes d'intérêts sont immobilisées entre une membrane de dialyse (perméable au glucose et à l'oxygène) et une membrane de téflon (perméable à l'oxygène seul) protège la sonde polarographique (électrode de Clark) assurant la détection ampérométrique de la concentration en oxygène dissous. L'oxydation du glucose par l'enzyme glucose-oxydase diminue l'afflux d'oxygène au niveau de l'électrode de Clark qui se traduit par une baisse du courant mesuré.

Les biosenseurs trouvent des applications dans de nombreux domaines allant de l'analyse médicale ou pharmaceutique jusqu'au contrôle qualité dans l'industrie alimentaire, à la surveillance environnementale et la sécurité-défense. Cependant, comme l'attestent les travaux présentés lors de la dernière conférence internationale *Biosensors 2012*, le développement technologique s'effectue massivement dans le domaine de l'analyse médicale extemporanée et la surveillance à domicile des patients. Les analyseurs de glucose sanguin représentent 85% du marché. D'un point de vue économique, le marché des biosenseurs représente pas moins de treize milliards de dollars américains (Newman et Turner, 2005) et le nombre de publications annuelles dans les principales revues scientifiques dédiées aux biosenseurs ne cesse de croître : 10% du nombre de publications publiées au cours de ces trente dernières années..! (Turner, 2013).

Du point de vue de la R&T, les moyens se concentrent sur le développement de nouveaux systèmes de détection « universels » ultrasensibles comme la Résonance Plasmonique de Surface (RPS) et sur le développement de systèmes de reconnaissance moléculaire plus spécifique et sensible comme les aptamères « beacons ». Ces technologies sont surtout développées pour analyser des biopuces à ADN, ARN, anticorps... et associées à des dispositifs de microfluidiques pour étudier des interactions molécule-particule (e.g. protéine-vésicule). Dans le cas, des biosenseurs à cellules entières, pour lesquels les transducteurs sont classiquement électrochimiques ou optiques, les problèmes de R&T concernent plus la stabilisation et l'immobilisation des cellules sensibles au droit du système de transduction. L'utilisation de la cellule entière comme biosenseur, au cœur de cette étude, sera traitée de manière plus approfondie ultérieurement.

2. Les transducteurs

Pour transformer le signal de reconnaissance en un signal mesurable et interprétable, les biosenseurs intègrent, en général, des transducteurs électriques ou optiques, même si d'autres catégories majeures existent : piézométrie et calorimétrie.

2.1. Transducteurs électriques

Exploitant la loi d'Ohm, ces transducteurs « voltampérométriques » sont les plus répandus, les plus diversifiés, mais surtout les plus simples à mettre en œuvre. Un courant ou une différence de potentiel est mesuré sous potentiel imposé ou non. Aujourd'hui, grâce au progrès de l'électronique, il est possible de mesurer des courants électriques très faibles de l'ordre du pico-ampère. On peut les différencier selon qu'ils utilisent un voltmètre ou ampèremètre comme détecteurs (Su *et al.* 2011).

Les détecteurs ampérométriques mesurent l'intensité du courant généré par la réduction ou l'oxydation d'une espèce électro-active (molécule cible ou intermédiaire réactionnel) à la surface de l'électrode de travail (Ding *et al.* 2008). La technique est mise en œuvre en appliquant un potentiel fixe entre l'électrode de travail et l'électrode de référence puis en détectant la présence d'un courant dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce électro-active. Les biosenseurs ampérométriques possèdent un avantage sélectif par le fait que le potentiel de réduction ou d'oxydation appliqué pendant la mesure est caractéristique de l'espèce étudiée. A l'inverse, la potentiométrie mesure une différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence lorsqu'aucun courant électrique ne circule entre ces dernières (Grieshaber *et al.* 2008). Comme pour l'électrode pH, la mesure du potentiel s'effectue au travers d'une membrane ou d'un cristal poli sensible à l'ion d'intérêt : la diffusion ou l'adsorption de l'ion au travers ou sur l'élément sensible génèrent un potentiel électrique correspondant à l'activité chimique de l'ion (Bobacka *et al.* 2008). Bien que très sélectifs, ces senseurs potentiométriques sont très sensibles aux salissures et à la stabilité du pont électrochimique entre les électrodes de référence et de travail.

La voltamétrie est une technique hybride, qui mesure l'intensité du courant produit par les espèces électro-actives en fonction du potentiel appliqué entre les électrodes (Niina *et al.* 2010). La position du pic et l'intensité sont caractéristiques de l'espèce chimique et de sa concentration respectivement. Le bruit de fond restant très faible, le balayage en potentiel favorise la détection multiple de composés en une seule mesure. Associé à une étape dite de pré-concentration et à un mode de balayage spécifique (linéaire, cyclique, à impulsion différentielle...), la voltamétrie est une des techniques de détection électrochimique les plus versatiles et sensibles existantes (Kissinger et Heineman, 1996 ; Wang, 1985).

2.2. Transducteurs conductimétriques

Privilégiant la mesure d'une résistance ohmique ou d'impédance sous courant imposé, les transducteurs conductimétriques mesurent les variations de conductivité/résistivité d'une solution ou d'un matériau, i.e. sa capacité à conduire ou non un courant électrique. La mesure d'impédance est généralement effectuée à partir d'une tension sinusoïdale (typiquement de fréquence 1-3 kHz) appliquée entre les électrodes (Mohanty et Kougiannos, 2006). La mesure d'impédance d'un support ou d'une solution est sensible au transfert d'électrons ou au transfert de masse selon qu'elle est réalisée à haute fréquence ou basse fréquence respectivement (Grieshaber *et al.* 2008). Elles offrent ainsi la possibilité de détecter des événements physicochimiques particuliers comme des reconnaissances anticorps/antigène (van Emon, 2007 ; Tang *et al.* 2007).

Il existe d'autres types de transducteurs conductimétriques miniatures comme les transistors à effet de champ qui utilisent un champ électrique pour contrôler la forme et donc la conductivité d'un canal reliant deux électrodes au travers d'un matériau semi-conducteur (Colapicchioni *et al.* 1991).

2.3. Transducteurs calorimétriques

Les senseurs calorimétriques ou thermiques détectent les variations de température du milieu dans lequel ils se trouvent. La variation de température étant provoquée par des réactions exo- ou endothermiques. Une fois la calibration effectuée, la variation positive ou négative de la température est proportionnelle à l'enthalpie molaire de la réaction et aux nombres de molécules impliquées dans la réaction. La mesure s'effectue par l'intermédiaire d'une thermistance, i.e. matériau (*e.g.* oxydes métalliques) dont la résistance électrique varie en fonction de la température. Ce type de détection s'avère moins sensibles aux perturbations extérieures (grandeurs d'influence) que les détections électrochimiques ou optiques. De plus, une fois mis en place, les senseurs thermiques restent stables dans le temps et requièrent peu de re-calibration (Monošík *et al.* 2012).

2.4. Transducteurs optiques

Récemment, le développement des biosenseurs à transducteur optique connaît un essor considérable, principalement dû à la disponibilité de composants optoélectroniques et de fibres optiques de hautes qualités et à des prix abordables. Les transducteurs optiques détectent ainsi des variations d'intensité dans les spectres d'absorption ou d'émission de lumière (fluorescence, phosphorescence, Raman...) du biosenseurs ou du régime de propagation des ondes lumineuses (réflexion, polarisation, diffusion, ...) au voisinage de celui-ci. Des dispositifs techniques utilisant par exemple la résonance plasmonique de surface, l'interférométrie ou la spectrométrie par guide d'ondes (*e.g.* senseur à miroir résonant) améliore la résolution et/ou la sensibilité de ces méthodes de détection. Le principal avantage des biosenseurs optiques réside dans leur rapidité, leur insensibilité aux perturbations électro-magnétiques et surtout, dans leur capacité à fournir une vision plus complète de la réponse des biosenseurs, notamment via l'acquisition de données hyperspectrales (Borisov et Wolfbeis, 2008 ; Fan *et al.* 2008 ; Velasco-Garcia, 2009).

3. Les éléments sensibles

Une grande variété d'éléments biologiques a été employée pour le design et la réalisation de biosenseurs. On peut cependant distinguer deux catégories majeures : les biosenseurs d'affinités et les biosenseurs catalytiques.

3.1. Les biosenseurs d'affinité

Les biosenseurs d'affinité contiennent des molécules organiques possédant une très forte affinité pour l'analyte d'intérêt. Ces molécules spécifiques peuvent être des anticorps, des récepteurs membranaires ou des acides nucléiques (*e.g.* aptamères). Leurs caractéristiques au travers des différents transducteurs sont bien documentées (Su, 2011 ; Niina, 2010 ; Borisov et Wolfbeis, 2008).

3.2. Les biosenseurs catalytiques

Ce type de biosenseur incorpore un élément biologique capable d'interagir chimiquement et de manière spécifique avec l'analyte d'intérêt. Les enzymes, protéines catalysant de manière hautement spécifique une réaction chimique, sont les éléments les plus communément utilisés dans le design de ces biosenseurs (Turner *et al.* 1992). Depuis l'élaboration du biosenseur enzymatique de Clark, une grande variété de biosenseurs catalytiques a vu le jour. Les principales catégories sont résumées dans le tableau 1 ci-après (Monošík *et al.* 2012).

Cependant, leur utilisation soulève certains problèmes. Le premier est d'ordre économique. La procédure d'extraction et de purification est longue et coûteuse. Le second est matériel. Une fois extraites et purifiées, les enzymes (majoritairement cytoplasmiques) peuvent perdre leur stabilité structurale et voir leur activité décroître. De plus, certaines nécessitent l'apport de cofacteurs/coenzymes rendant leur utilisation délicate (D'souza, 2001 ; Lei *et al.* 2006).

Tableau 1 : Principales catégories d'enzymes utilisées pour le design de biosenseurs catalytiques.

Catégorie d'enzyme	Fonction	Molécules Cibles / Analyte d'intérêt
Oxydoréductase	Réaction d'oxydation/réduction	Alcool [Smutok <i>et al.</i> 2006], Cholestérol [Vidal <i>et al.</i> 2004], Malate [Arif <i>et al.</i> 2002], lactate [Pereira <i>et al.</i> 2007], Glycérol [Álvarez-González <i>et al.</i> 2000], Fructose [Trivedi <i>et al.</i> 2009], Acides aminés [Sacchi <i>et al.</i> 1998]
Transférase	Transfère d'un groupe fonctionnel d'une molécule à une autre	Acide acétique [Mizutani <i>et al.</i> 2003], Xénobiotique [Choi <i>et al.</i> 2003, Andreou & Clonis 2002]
Hydrolase	Rupture de liaison OH par production d'une molécule d'eau	Sucrose [Sassolas <i>et al.</i> 2012]
Lyase	catalyse la rupture de différentes liaisons covalentes	Acide citrique [Maines <i>et al.</i> 2012]
Isomérase	Réarrangement intramoléculaire	Norandrostenedione [Sheu <i>et al.</i> 2008]
Ligase	Ligation de deux molécules	ADN, détection de mutation ponctuelle [Pang <i>et al.</i> 2006]

3.3. Les biosenseurs catalytiques à cellules entières

Pour pallier ces problèmes, l'emploi de tissus vivants (*e.g.* épiderme de plantes) ou de cellules entières (*e.g.* suspensions de microorganismes) s'est révélé être une alternative intéressante. A titre d'exemple original, la « bananatrode », électrode à la surface de laquelle est immobilisé du tissu de banane, fut l'un des tous premiers biosenseurs basés sur l'utilisation de tissus biologiques (Sidwell & Rechnitz, 1985). En effet, la banane contient une importante quantité de polyphénol oxydases qui se révèlent très efficace pour la détection spécifique de la dopamine. Toutefois, l'utilisation de microorganismes (*e.g.* bactéries, champignons/algues unicellulaires) offre des possibilités plus avantageuses. Comparé aux systèmes eucaryotes pluricellulaires, ils peuvent être produits en masse sans difficulté et s'avèrent plus stables *in vitro* (D'souza, 2001 ; Lei *et al.* 2006, Harms *et al.* 2006). De plus, leur faculté d'adaptation et l'accumulation des connaissances en biologie moléculaire de ces vingt dernières années facilitent leur manipulation. Des constructions génétiques dédiées ou génériques plus ou moins élaborées peuvent être intégrées dans des microorganismes hôtes ne possédant pas les voies métaboliques spécifiques pour l'analyte d'intérêt.

4. Les biosenseurs bactériens à cellule entière

4.1. Biosenseurs à détection électrochimique

De nombreux systèmes cellulaires microbiens ont été couplés aux systèmes de transduction présentés précédemment (Su *et al.* 2011). La détection ampérométrique a été l'un des moyens les plus largement utilisé, comme le montrent les deux exemples suivant, illustrant l'adaptation d'un microorganisme à un analyte particulier en modifiant la régulation ou l'expression de certains gènes.

En 2007, Timur *et al.* ont développé un biosenseur bactérien ampérométrique pour la détection du phénol à partir d'une souche de *Pseudomonas putida* DSMZ 50026. Ils ont « forcé » la souche *P. putida* à utiliser ce composé aromatique comme source d'énergie (Timur, S. *et al.* 2007), en la cultivant quotidiennement dans des milieux à concentration croissante en phénol jusqu'au seuil souhaité (250 mg/l). L'activité respiratoire de la souche ainsi adaptée est alors directement reliée à la concentration en phénol. La détection du transfert d'électron des métabolites réduits issus de la respiration vers l'électrode s'effectue par l'intermédiaire d'un polymère.

En 2005, Lei *et al.* ont proposé de modifier génétiquement la souche *Pseudomonas putida* JS444 pour la détection simultanée du *p*-nitrophénol (PNP; polluant, précurseur pour la synthèse de la phénétidine, de l'acétophénétidine ou encore du paracétamol) et de composés OrganoPhosphorés (OP ; pesticides neurotoxiques) (Lei *et al.* 2005). La souche JS444 étant capable de métaboliser naturellement le PNP, la détection ampérométrique des métabolites

électroactifs issus de la dégradation du PNP, ne posait pas de problème majeur (Nishino, & Spain, 1993). En revanche, pour détecter conjointement les composés OP, Lei *et al.* ont eu recours à une enzyme cytoplasmique, présente chez *Pseudomonas diminuta* MG et *Flavobacterium* sp, une hydrolase de composés organo-phosphorés (OPH), capable de dégrader les OP en PNP (Mulbry & Karns, 1989 ; Serdar *et al.* 1989). L'idée était d'exprimer l'OPH sur la membrane externe de la bactérie afin de dégrader les OPs en PNP dans le milieu extracellulaire (afin de réduire les risques de toxicité intracellulaire) et permettre ainsi leur dégradation. L'adressage de l'enzyme au niveau de la membrane externe a été réalisé en fusionnant le gène codant l'OPH au gène *inaK* tronqué. Le gène *inaK* de *Pseudomonas syringae* code la protéine INP (Ice Nucleation Protein), une protéine dont le domaine N-terminal se lie aux ancras GPI (glycosylphosphatidylinositol ; glycolipide naturel permettant l'ancrage de diverses protéines à la surface de la membrane cellulaire) (Shimazu *et al.* 2001 ; Sarhan, 2011). En fusionnant la protéine INP à une protéine d'intérêt, il est alors possible d'adresser cette protéine au niveau de la membrane externe. Des études ont montré que seul le domaine N-terminal de la protéine INP était nécessaire à l'adressage membranaire (Lee *et al.* 2003). La dégradation du PNP donne lieu à des métabolites particulièrement électroactifs que Lei *et al.* détectèrent par l'utilisation d'une électrode à pate de carbone.

D'autres exemples récents d'utilisation de microorganismes pour la détection électrochimique de divers analytes sont présentés dans le tableau 2.

Les limites de détection des biosenseurs bactériens couplés à des transducteurs électrochimiques peuvent être extrêmement basses et sont conditionnées par la précision des mesures des courants électriques générés, la quantité d'enzymes et le maintien des conditions optimales d'activités. Cependant, leur utilisation en milieux complexes sera toujours limitée par leur principe de mesure : la détection d'espèces chimiques, indicatrices de l'activité biologique du microorganisme et non l'observation directe de l'activité de leurs voies de production. En effet, en raison de la complexité des réseaux métaboliques cellulaires et des multiples interactions intracellulaires (chevauchement de cascades métaboliques/couplage de signaux environnementaux), la mesure perd en robustesse, le système n'étant plus complètement linéaire. De plus, si la stabilité de l'électrolyte produit est affectée par des interactions déplétives ou supplétives avec le milieu environnant, la mesure est faussée. Ainsi, la méconnaissance du fonctionnement d'une composante clé du système nuit à l'interprétabilité des résultats. Le développement des marqueurs génétiques apporte des solutions à ce type problème, en axant la mesure sur l'expression génétique et non plus sur la production de métabolites.

Tableau 2 : Transducteurs et électrodes utilisés pour la réalisation de biosenseurs bactériens à détection électrochimique

Microorganisme	Électrode de travail	Transducteur	Analyte d'intérêt	Limite de détection	Références
<i>Pseudomonas putida</i> JS444	Pate de carbone	ampérométrique	Parathion	1 nM	[Lei, 2005]
<i>Moraxella</i> sp	Pate de carbone	ampérométrique	p-Nitrophenol	20 nM	[Mulchandani. <i>et al.</i> 2005]
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Platine/Argent (type Clark)	ampérométrique	Choline	80 nM	[Stoytcheva. <i>et al.</i> 2006]
<i>P. putida</i> JS444	Pate de carbone	ampérométrique	Fenitrothion/EPN	5.1 nM / 5 nM	[Lei. <i>et al.</i> 2007]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Électrode à oxygène	ampérométrique	Cu ²⁺	33 nM	[Tag. <i>et al.</i> 2007]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Platine (inter-digité)	conductimétrique	Cadmium/Zinc	90 nM	[Chouteau <i>et al.</i> 2005]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Platine (inter-digité)	conductimétrique	Cadmium	9 nM	[Guedri & Durrieu, 2008]
<i>Circinella</i> sp.	Pate de carbone	Potentiométrique	Cu ²⁺	54 nM	[Alpat <i>et al.</i> 2008]
<i>Consortium bactérien</i>	Graphite	Potentiométrique	glucose	140 nM	[Kumlanghan <i>et al.</i> 2007]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Verre borosilicaté	Potentiométrique	Cephalosporins	100 nM	[Kumar <i>et al.</i> 2008]

4.1. Biosenseurs à détection optique

L'expression des gènes dans un organisme peut être mesurée à l'aide de gènes rapporteurs, codant une protéine rapporteur dont les propriétés optiques sont facilement détectables et mesurables (luminescence, fluorescence, absorption...). En plaçant ces gènes rapporteurs sous le contrôle de gènes dont l'expression est liée au métabolisme d'un analyte spécifique, il est possible de détecter cet analyte en mesurant la production de protéine rapporteur. L'insertion de gènes rapporteurs dans une cellule est réalisée par la technique de fusion de gènes. Elle peut se faire aussi bien au niveau chromosomique que plasmidique par l'utilisation d'outils moléculaires tels que les transposons ou de techniques de clonages. Si le système rapporteur est inséré en aval d'un promoteur et dans le sens d'expression, il peut alors servir à l'étude de la régulation d'un gène d'intérêt.

Le Tableau 3 présente les différents types de protéines et gènes utilisés aujourd'hui pour la construction de systèmes rapporteurs.

Tableau 3 : Spécification des principaux gènes et protéines utilisés dans la construction de systèmes rapporteurs

Protéine	Gène rapporteur	Origine	Substrat	Détection	Contraintes d'utilisation	Références
Luciférase bactérienne	<i>luxAB</i> ou <i>uxCDAB E</i>	Bactéries bioluminescentes	O ₂ , FMNH ₂ , aldéhydes	bioluminescence	Aldéhydes nécessaires si LuxAB utilisé	[Engebrecht <i>et al.</i> 1985 - Meighen, 1991]
Luciférase (luciole)	<i>lucFF</i>	Luciole (<i>Photinus pyralis</i>)	O ₂ , ATP, luciférine	bioluminescence	Milieu aérobie	[Devine <i>et al.</i> 1993]
Luciférase (élatéridés)	<i>lucGR</i>	Elatéridés (<i>Pyrophorus Plagiophthalmus</i>)	O ₂ , ATP, pholasin	bioluminescence	Milieu aérobie	[Wood <i>et al.</i> 1989]
Luciférase (renilla)	<i>rluc</i>	<i>Renilla reniformis</i>	Coelenterazine, Ca ²⁺	bioluminescence	Milieu aérobie	[Loening <i>et al.</i> 2007]
β-galactosidase	<i>lacZ</i>	<i>Escherichia coli</i>	Galactopyranosides	luminescence, colorimétrie, électrochimie fluorescence	Ajout de substrat ; perméabilisation des cellules nécessaire	[Daunert <i>et al.</i> 2000]
Protéines fluorescentes UV-vis	<i>gfp</i> , <i>dsRed</i> ...	<i>Aequorea victoria</i> et d'autres invertébrés marins	/	fluorescence	Milieu aérobie pour maturation	[Prasher, 1995- Shaner, <i>et al.</i> 2004 - 2008]
Sphéroidène mono-oxygénase	<i>crtA</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>	Sphéroidène	colorimétrie	/	[Yagi, 2007]
Protéines fluorescentes infrarouge	divers	Famille des Bacteriophytochromes	/	fluorescence	/	[Shu, <i>et al.</i> 2009]
Protéines fluorescentes à flavine mononucleotide (FMN)	divers	<i>Bacillus subtilis</i> et <i>Pseudomonas putida</i>	/	fluorescence	Milieu aérobie et anaérobie, nécessite FMN endogène	[Drepper <i>et al.</i> 2007]

5. Les biosenseurs bactériens environnementaux

L'utilisation de gènes rapporteurs pour l'analyse environnementale remonte au début des années 80 avec les travaux de Quillardet *et al.* (Quillardet, P. *et al.* 1982). Ils modifièrent la souche bactérienne *Escherichia coli* K12 de sorte qu'elle produise l'enzyme β-galactosidase lorsque le gène du régulon SOS inhibiteur de la division cellulaire *sfiA* était induit. Ce dernier, exprimé en réponse à une altération de l'ADN, détectait ainsi la présence de substances génotoxiques dans l'environnement cellulaire. Il s'agit d'un biosenseur de catégorie 1 (Figure 2), c'est-à-dire qu'il mesure un effet physiologique général (*e.g* une toxicité, un stress physique ou chimique...). Il n'est pas spécifique d'une substance cible en particulier mais plutôt à une classe de substances. Dans cette étude, le gène de la β-galactosidase, *lacZ*, a été inséré dans le génome d'*E.coli* par l'intermédiaire du phage Mu d(Ap, *lac*), qui possède l'opéron *lac* dénué de promoteur à l'une des extrémités de son génome (Casadaban & Cohen, 1979). Cette insertion chromosomique en amont du gène *sfiA* transforme le système SOS en un senseur *sfi::lacZ*

biochimique, l'activité β -galactosidase, indiquant l'intensité d'un stress génotoxique, sans toutefois en identifier la cause.

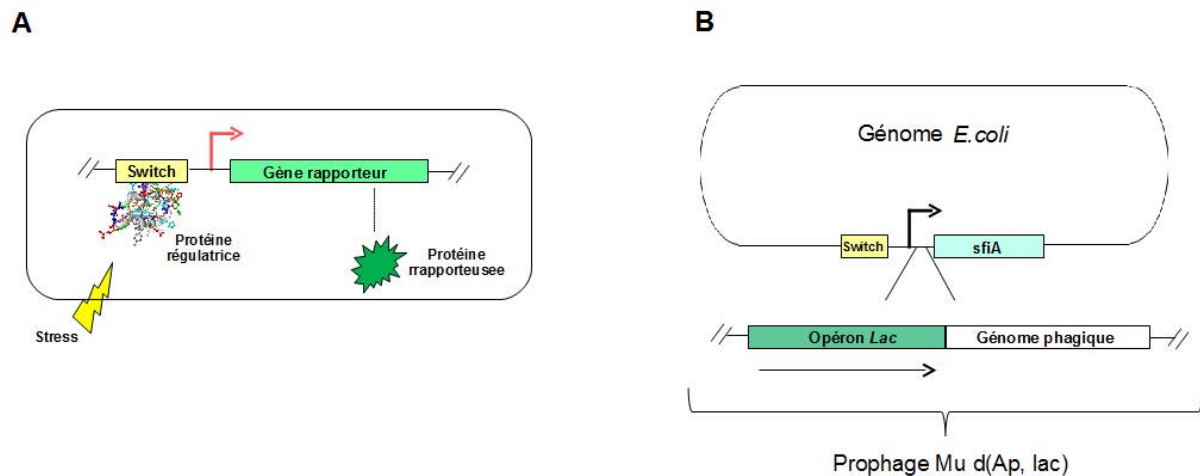


Figure 2 : Design d'un biosenseur cellulaire de type 1. **A-** Lors d'un stress affectant l'intégrité structurale ou fonctionnelle de la cellule (génotoxique, choc osmotique, thermique, etc), des réponses s'enclenchent afin de protéger la cellule ou réparer les dégats aux constituants cellulaires. Les biosenseurs cellulaires de type 1 sont basés sur le monitoring de ces voies métaboliques. En présence d'un stress, les protéines régulatrices actionnent le rupteur (« switch ») et activent la transcription des systèmes protecteurs ou réparateurs concernés]. **B-** Construction génétique élaborée par Quillardet *et al.* (1980) permettant la détection de l'altération de l'ADN par la production de β -galactosidase. L'insertion chromosomique a été réalisée en amont du gène *sfiA* via la phage Mud(Ap, lac).

La démonstration de l'intérêt de systèmes rapporteurs plus spécifiques pour le monitoring environnemental et la détection de substances « cibles » biodisponibles fut publiée en 1990 par King *et al.* (1990). Dans leur expérience, la souche bactérienne *Pseudomonas fluorescens* 5R a été modifiée avec un rapporteur bioluminescent afin d'émettre de la lumière en présence de naphthalène. Cette souche possède une voie métabolique assurant la dégradation du naphthalène en acétaldéhyde et pyruvate. Cette capacité est assurée par deux opérons portés par un plasmide (pKA1) : l'opéron *nah* (gènes *nahA*→*F*) qui code les enzymes permettant la conversion du naphthalène en salicylate et l'opéron *sal* (gènes *nahG*→*M*) qui code les enzymes métabolisant le salicylate en intermédiaires du cycle de Krebs (Schell & Wender, 1986). Entre ces deux opérons se situe le gène *nahR* qui est exprimé de manière constitutive et qui code un activateur transcriptionnel dépendant du salicylate-. En absence de salicylate, les deux opérons sont exprimés très faiblement. En revanche, si du naphthalène pénètre dans la cellule, une partie de ce naphthalène sera métabolisé en salicylate. L'activation de *nahR* par le salicylate multipliera par 20 l'expression des opérons *nah* et *sal*. Le système rapporteur *luxCDABE* permettant la production endogène de bioluminescence, inséré dans le gène *nahG* par l'intermédiaire d'un transposon transforme la cellule en un biosenseur luminescent. Le signal lumineux émis est alors proportionnel à l'activité du promoteur de l'opéron *sal* (figure 3B). En raison de sa spécificité, ce biosenseur appartient à la catégorie 2. Contrairement au système *sfiA* décrit précédemment, il est spécifique d'un contaminant organique, fréquemment rencontré, dans les friches industrielles, le naphthalène. Toutefois avec ce biosenseur, la détection par luminescence du naphthalène est indirecte puisque la protéine régulatrice de la voie métabolique NahR, est sensible à un intermédiaire réactionnel, le salicylate, et non directement à la substance cible, i.e. le naphthalène.

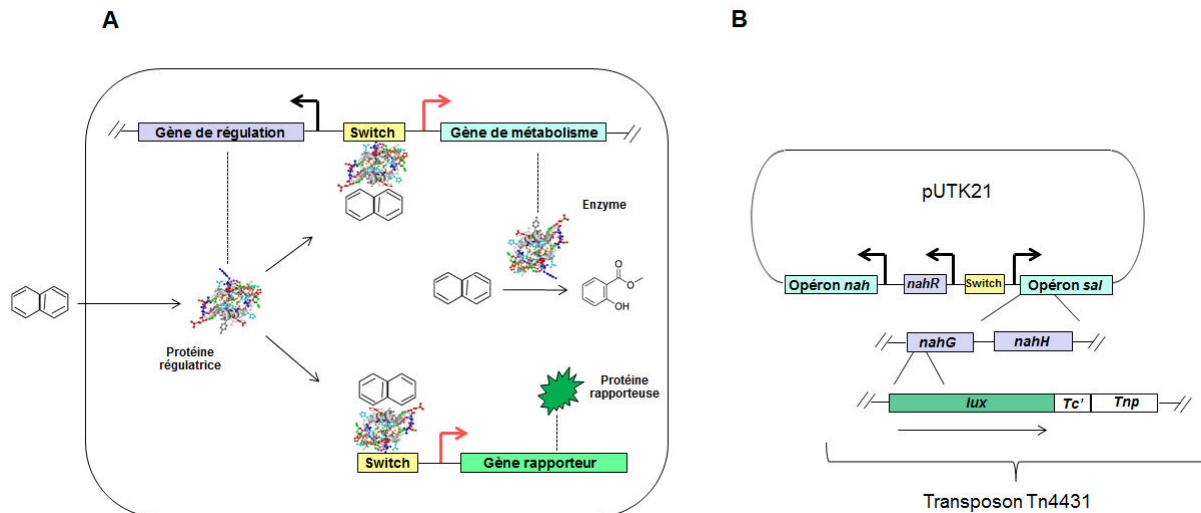


Figure 3: Design d'un biosenseur cellulaire de type 2. **A-** L'organisme hôte est capable de métaboliser le composé d'intérêt. Une protéine régulatrice, exprimée de manière constitutive, détecte la présence du composé (changement de conformation) et autorise l'expression des gènes métaboliques en actionnant un rupteur : site d'activation ou « switch ». **B-** Construction plasmidique (pUTK21) élaborée par King *et al.* (1990) pour la détection indirecte du naphthalène par bioluminescence. Le transposon Tn4431 contenant le système rapporteur lux est inséré dans le gène *nahG* de l'opéron *sal* du plasmide (*Tc* : gène de résistance à la tétracycline, *Tnp* : gènes nécessaires à la transposition) [73].

Ainsi, en clonant un promoteur inductible par un composé spécifique en amont d'un gène rapporteur sur un plasmide ou en insérant directement un système rapporteur en aval du promoteur au sein du chromosome de l'hôte, il est possible de détecter la présence de ce composé voire d'estimer sa biodisponibilité. En fonction de la spécificité de l'élément sensible, i.e. la protéine régulatrice et du promoteur sélectionné, la détection sera directe ou indirecte (Van der Meer & Belkin, 2010).

S'inspirant de ces études, de nombreux biosenseurs bactériens furent développés en ciblant l'activité de promoteurs contrôlant l'expression de protéines (le plus souvent des enzymes) spécifiques d'une voie métabolique (Tableau 5). Toutefois, il existe des biosenseurs dont l'expression du rapporteur est directement induite par la présence intracellulaire du composé d'intérêt et non indirectement par des métabolites ou des intermédiaires réactionnels. Généralement, les promoteurs concernés contrôlent des systèmes de résistance face à des contaminants potentiels ou des substances toxiques (*e.g.* métaux lourds, antibiotiques...). Ces systèmes plus simples, font intervenir généralement une seule protéine de régulation. Les premiers biosenseurs de ce type sont réalisés au début des années 90 et servaient à la détection du mercure et de l'arsenic (Selifonova *et al.* 1993; Virta *et al.* 1995; Ramanathan *et al.* 1997, Tauriainen *et al.* 1997). Par exemple, Selifonova *et al.* (1993) ont couplé l'opéron *lux* au système génétique *merR-P_{merT}* de l'opéron *mer* (*merTPCADE*) d'*E.coli* (transposon Tn21), porteur du système de détoxification du mercure.

En présence de mercure Hg^{2+} , la protéine de régulation *merR* active l'expression de l'opéron *mer* par l'intermédiaire du promoteur *P_{merT}*. En 1995, Virta *et al.* ont montré qu'il était possible de détecter la présence de mercure dans l'eau avec ce type de biosenseur jusqu'à une concentration de 0.1 fM (Virta *et al.* 1995). Même si ces concentrations extrêmement faibles sont peu représentatives des environnements naturels, il serait possible d'apprécier des expositions chroniques aux métaux lourds à des doses faibles (<nM) à l'aide de biosenseur. Ceci constitue une alternative intéressante aux techniques analytiques lourdes (*e.g.* génération d'hydrures couplée à une ICP-MS), dont les spécifications et les coûts environnés sont difficilement compatibles avec un monitoring *in situ* et à « haute » fréquence. Le Tableau 4 présente les seuils de détection pour l'arsenic, le cadmium, le plomb, et le mercure des cinq principales techniques d'analyse physico-chimique par rapport à la concentration limite admissible dans une eau

potable selon la Food and Drug Administration (FDA). Pour les éléments traces et métaux lourds cités, le seuil de détection des biosenseurs bactériens en milieu aqueux est de l'ordre de la nanomole, soit un niveau de sensibilité quasi-équivalent à ceux obtenus avec des analyseurs spectrométriques conventionnels et qui demeure en adéquation avec les attentes sanitaires.

Tableau 4 : Limite de détection des principales méthodes d'analyses physico-chimiques (en μM) pour quatre métaux lourds toxiques As, Cd, Pb, Hg. La concentration limite admissible pour une eau potable selon la FDA est indiquée entre parenthèses. Les limites de détection les plus basses pour les biosenseurs sont reportées (Cf tableau 5)

	FAAS ¹	GFAAS ²	ICP-AES ³	ICP-MS ⁴	XRF ⁵	Biosenseur
Arsenic (0,1 μM)	2	0,013	0,27	$< 0,7 \cdot 10^{-3}$	13,35	$5 \cdot 10^{-3}$
Cadmium (0,04 μM)	$7 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$	$0,9 \cdot 10^{-3}$	$< 0,5 \cdot 10^{-3}$	446	$3 \cdot 10^{-3}$
Plomb (0,02 μM)	0,072	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-3}$	$< 0,2 \cdot 10^{-3}$	24	$3 \cdot 10^{-3}$
Mercurure (0,01 μM)	1,5	$3 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$< 0,3 \cdot 10^{-3}$	25	$< 0,1 \cdot 10^{-3}$

FAAS : Flame Atomic Absorption Spectroscopy
 GFAAS : Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy
 ICP-AES : Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy
 ICP-MS : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectroscopy
 XRF : X-Ray Fluorescence Spectrometry

Aujourd'hui, le développement des biosenseurs bactériens tend à démontrer la possibilité de s'affranchir des techniques d'analyses physico-chimiques certes sensibles, mais nécessitant l'emploi d'appareil coûteux à l'achat ou à l'utilisation. La mise en place de protocoles robustes peut s'avérer fastidieuse. Le Tableau 5 présente un aperçu des principaux types de biosenseurs bactériens à détection optique développés jusqu'à présent pour un large éventail de composés métalliques et organiques..

6. Problématiques actuelles

Depuis les années 80, les techniques d'analyses intégrant des biosenseurs bactériens se sont beaucoup diversifiées. Certaines servent à détecter des composés volatils en immobilisant les biosenseurs bactériens dans une microgoutte placée au-dessus de l'échantillon (e.g détecteur d'explosif à base de trinitrotoluène "TNT") [Galvão *et al.* 2007; De Las Heras *et al.* 2008]. D'autres utilisent des cellules immobilisées au sein d'une matrice de gel connectée à un capillaire dans le but de détecter les composés peu solubles dans l'eau, mais capables de diffuser à travers le gel, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Van der Meer & Belkin, 2010). Beaucoup d'efforts ont été aussi menés dans le développement de techniques d'immobilisation de cellules dans des gels d'agar (Lee *et al.* 2005), d'agarose (Tani *et al.* 2004), de silice via des procédés sol-gel (Rajan Premkumar *et al.* 2002) ou d'alginate (Fesenko *et al.* 2005) afin d'accroître leur stabilité temporelle et d'assurer une position optimale au sein du senseur.

Toutefois, tous ces efforts techniques et innovations sont déployés dans un seul but : miniaturiser au maximum les appareils de mesures afin d'accroître leur portabilité et leur attractivité commerciale. C'est cet objectif technico-commercial qui soutient, aujourd'hui, le développement de nouveaux systèmes basés sur les technologies de réseaux microfluidiques, de biopuces, utilisant des nano-composites (Lee *et al.* 2005 ; Tani *et al.* 2004 ; Rajan Premkumar *et al.* 2002 ; Fesenko *et al.* 2005 ; Tani *et al.* 2007 ; Ahn *et al.* 2004 ; Ron 2007).

Tableau 5 : Limites de détection des principaux systèmes génétiques employés pour la réalisation de biosenseurs bactériens à cellules entières. Le système de transduction est couplé à une détection optique.

Protéines senseurs	Organisme hôte	Système génétique	Molécules détectées	Sensibilité	Références
<i>NahR</i> (<i>P.putida</i>)	<i>P.putida</i>	<i>nahGp-luxAB</i>	Naphtalène et salicylate	10 nM	[Werlen, <i>et al.</i> 2004]
<i>ArsR</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>arsRp-luxAB</i>	Arsénite et antimoine	5 nM	[Baumann, <i>et al.</i> 2007]
<i>MerR</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>merTp-luxCDABE</i>	Hg	1 fM	[Virta <i>et al.</i> 1995]
<i>CadC</i> (<i>S.aureus</i>)	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>cadCp-lucFF</i>	Cd, Pb, Sn et Zn	3 nM	[Tauriainen, <i>et al.</i> 1998]
<i>ZntR</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>zntAp-luxCDABE</i>	Zn, Pb et Cd	5 µM, 0.7 µM et 10 nM respectivement	[Ivask <i>et al.</i> 2009]
<i>AlkS</i> (<i>P.oleovorans</i>)	<i>E.coli</i>	<i>alkBp-luxAB</i>	Alcanes C6-C10	10 nM	[Sticher <i>et al.</i> 1997]
<i>NisRK</i> (<i>L.lactis</i>)	<i>L.lactis</i>	<i>nisAp-gfpuv</i>	Nisine	3 pM en culture bactérienne, 60 pM dans le lait	[Hakovirta, <i>et al.</i> 2006]
<i>LuxR</i> (<i>A.fischeri</i>)	<i>E.coli</i>	<i>luxIp-gfp[ASV]</i>	<i>N</i> -Acyl homoserine lactones	1-10 nM	[Wu <i>et al.</i> 2000]
<i>DmpR</i> (<i>P.putida</i>)	<i>P.putida</i>	<i>Po-luxAB</i>	phenol	3 µM	[Shingler, <i>et al.</i> 1987]
<i>TbuT</i> (<i>R.pickettii</i>)	<i>E.coli</i>	<i>tbuA1p-luxAB</i>	Benzène, toluène et xylène	0.24 µM	[Tecon, R. <i>et al.</i> 2009]
<i>HbpR</i> (<i>P.nitroreducens</i>)	<i>E.coli</i>	<i>hbpCp-luxAB</i>	Biphényles hydroxylés	0.4 µM	[Turner, K. <i>et al.</i> 2007]
<i>Crp-cAMP transcriptional dual regulator</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>grpEp-luxCDABE</i>	Augmentation du niveau de protéine mal repliées	0.14 µM	[Van Dyk, T. K. <i>et al.</i> 1994]
<i>Ada</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>alkAp-luxCDABE</i>	Agents alkylant de l'ADN	70 nM <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> nitrosoguanidine	[Vollmer <i>et al.</i> 1997]
<i>RecA-LexA</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>cdap-gfp</i>	géntotoxiques	5 nM <i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> nitrosoguanidine	[Norman <i>et al.</i> 2006]
<i>SepR</i> (<i>P. putida</i>)	<i>P. putida</i>	<i>epAp-luxCDABE</i>	solvant	0.5 mM	[Phoenix <i>et al.</i> 2003]
<i>RecA-LexA</i> (<i>S.enterica</i>)	<i>S. typhimurium</i>	<i>umuDp-lacZ</i>	géntotoxiques	10 nM mitomycinC	[Nakamura <i>et al.</i> 1987]
<i>OxyR</i> (<i>E.coli</i>)	<i>E.coli</i>	<i>katGp-luxCDAB</i>	Radicaux libres	Avec 3 µM H ₂ O ₂ par exemple	[Belkin <i>et al.</i> 1996]
<i>FruR</i> (<i>E.herbicola</i>)	<i>E.herbicola</i>	<i>fruBp-gfp[AAV]</i>	Fructose et sucrose	2 µM	[Leveau <i>et al.</i> 2001]

environnements complexes (Wang *et al.* 2012). Ce groupe a élaboré un circuit génétique capable de détecter et d'intégrer trois signaux environnementaux (l'arsenic As^{3+} , le mercure Hg^{2+} et le cuivre Cu^{2+}) et d'améliorer significativement le rapport signal sur bruit. Le circuit se divise en deux modules répartis sur deux populations cellulaires d'*Escherichia coli*. Chaque module est l'équivalent d'une porte logique « ET » en électronique (Figure 5A).

La première porte logique est constituée des deux gènes *hrpR* et *hrpS*, et d'un promoteur, P_{hrpL} , provenant du système *hrp* (hypersensitive response and pathogenecity) de *Pseudomonas syringae*. Les gènes *hrpR* et *hrpS* codent deux protéines régulatrices qui vont s'associer pour former un hétérodimère qui activera le promoteur *hrpL*. En amont de *hrpR* et *hrpS* ont été placés respectivement les systèmes génétiques synthétiques $ArsR-P_{arsR}$ et $MerR-P_{merT}$, activables respectivement par l'arsenic et le mercure. En présence d'arsenic As^{3+} , *ArsR* exprimé de manière constitutive, lève la répression du promoteur P_{arsR} et entraîne l'expression de *hrpR*. En présence de l'ion mercurique Hg^{2+} , *MerR*, exprimé de manière constitutive, se lie au promoteur P_{merT} et entraîne l'expression de *hrpR*. Le promoteur *hrpL*, quant à lui, contrôle l'expression du gène *luxI* qui code une enzyme permettant la synthèse d'une molécule de quorum-sensing, la 3-oxohexanoyl-homoserine lactone ($3OC_6HSL$), capable de diffuser librement à travers la membrane cellulaire.

La seconde porte logique est constituée du même système génétique *hrpR-hrpS- P_{hrpL}*, mais dont l'expression des gènes *hrpR* et *hrpS* a été placée sous le contrôle des promoteurs P_{luxI} et P_{CusC} respectivement. P_{luxI} est activé par la lactone ($3OC_6HSL$) tandis que P_{CusC} est activé par la protéine *CusR* (naturellement présente chez *E.coli*) en présence de cuivre (II). Le promoteur P_{hrpL} contrôle ici l'expression du gène rapporteur *rfp* codant une protéine fluorescente rouge.

Ainsi, la population de cellule possédant la première porte synthétisera la molécule $3OC_6HSL$ uniquement en présence d' As^{3+} et de Hg^{2+} , qui activera le promoteur P_{luxI} de la seconde porte présente au sein la seconde population de cellule. Si l'ion Cu^{2+} se trouve également dans le milieu, alors la protéine RFP sera synthétisée. Ce qui peut se resumer par la formulation logique suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Si } (As^{3+}) \text{ et } (Hg^{2+}) \text{ et } (Cu^{2+}) \text{ alors (RFP)} \\ & \text{ou } (As^{3+}) \wedge (Hg^{2+}) \wedge (Cu^{2+}) \Rightarrow (RFP) \end{aligned}$$

Comme le montre la Figure 5B, l'implémentation chez *E. coli* de cette porte logique ternaire fonctionne bien, la production de fluorescence est obtenue uniquement lorsque les trois métaux sont présents. De plus, le faible bruit « noir » (signal en l'absence d'au moins un métal) a été obtenu en ajustant l'affinité des sites de fixation des ribosomes (RBS) de chacun des promoteurs utilisés en fonction de leur réponse native respective. Le promoteur P_{arsR} a été couplé à une séquence RBS (rbs30) dite « très forte », le promoteur P_{CusC} a une séquence RBS (rbs31) « forte », le promoteur P_{merT} a une séquence RBS (rbs32) « faible », et le promoteur P_{luxI} à une séquence RBS (rbs33) « très faible ». Ainsi, la sensibilité et l'intensité de la réponse native de ces promoteurs a été modulée pour diminuer le signal de fluorescence en l'absence d'un métal et pour l'accroître lorsque les trois métaux sont présents.

Le niveau de réponse des promoteurs peut aussi être ajusté en variant la quantité de protéine régulatrice présente dans le cytoplasme. Typiquement, en augmentant la quantité de protéine *ArsR*, la sensibilité du senseur diminuait.

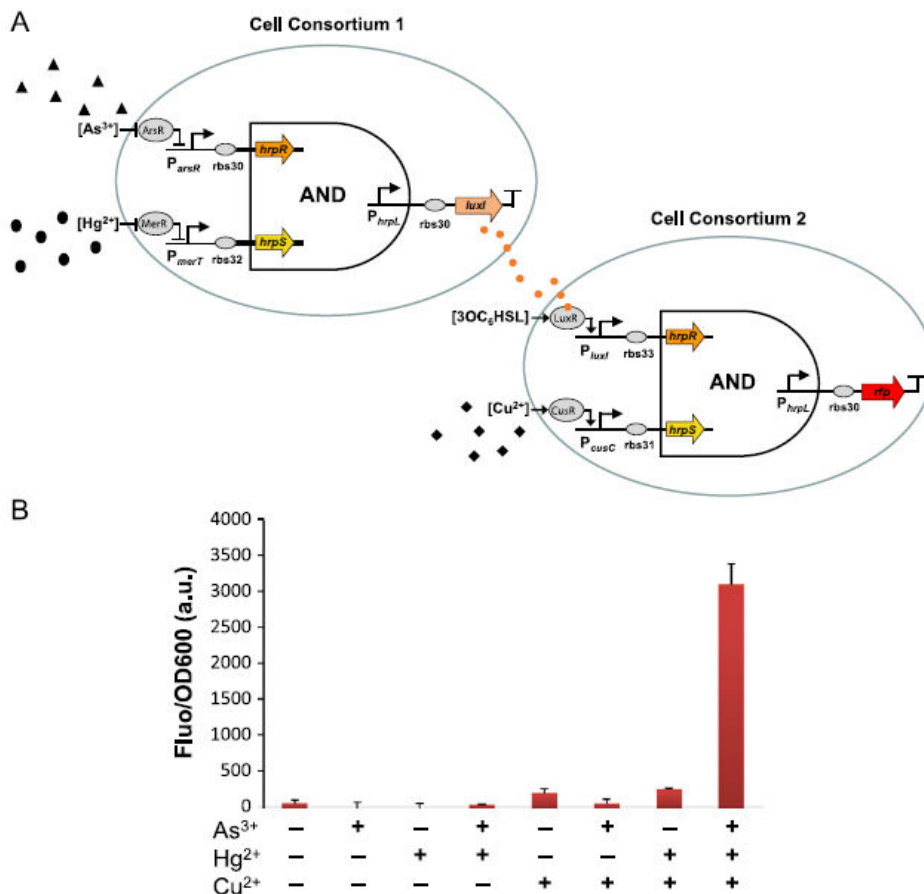


Figure 5 : Biosenseur cellulaire à trois entrées couplant deux souches d'Escherichia coli.

A- Chaque souche a été programmée avec une porte logique 'ET' qui permet la détection et l'intégration spécifique de deux signaux environnementaux. Le signal de sortie de la première population (3-oxohexanoyl-homoserine lactone 3OC6HSL), constitue l'un des signaux d'entrée de la seconde population.

B- Réponse du biosenseur aux huit combinaisons possibles de mélange d'arsenic (NaAsO₂ (8 mM), mercure (HgCl₂ 2 mM) et cuivre CuSO₄ (0.33 mM). Les mesures ont été réalisées à t=10h (n=3). Source : Wang et al. (2012).

Cependant, notre capacité à construire des circuits génétiques de manière rationnelle est fortement limitée par la divergence de comportement des différents blocs fonctionnels selon l'organisme dans lequel est implémenté le « programme » ou en fonction de l'état physiologique de l'organisme. Andrew D. Ellington, de l'Université du Texas, résume le problème ainsi : « nous sommes capable de dire qu'une partie du programme fonctionne d'une certaine façon dans un système qui n'est pas encore déterminé » (Ellington, 2011). La complexité inhérente au traitement non-linéaire de l'information par le vivant rend la modélisation de fonction biologique particulièrement difficile. De plus, un organisme est une « machine évolutive » et il a été montré que l'impact du temps sur la dynamique d'un système synthétique est significatif à court terme et peu prédictible. Par exemple, en 2008, Canton *et al.* ont élaboré un circuit simple qui permettait la synthèse de GFP en présence d'acyl homoserine lactone après production de la protéine LuxR (Canton *et al.* 2008). Ils ont observé que la production de GFP diminuait puis s'arrêtait après 30-40 générations. Outre ces faits fondamentaux, Herbert Sauro de l'Université de Washington a montré que la complexité d'un programme génétique croît avec le nombre de boucles (feedback) qui le compose (Sauro, 2011). Au-delà de deux, le système tend vers un comportement chaotique et requiert un nombre important de simulations pour l'appréhender. Ainsi, plus un système synthétique est grand et/ou complexe, moins il sera stable et compréhensible par les outils d'analyses mathématiques qui sont actuellement à notre disposition.

Par conséquent, les possibilités de créer ou transférer des fonctions biologiques de manière rationnelle et prédictive à partir de composants ADN standardisés se retrouvent fortement contraintes et limitées par le manque de connaissances fondamentales sur l'expression et la dynamique de l'information au sein d'une cellule vivante. Les avancées de la biologie synthétique sont donc étroitement liées aux avancées d'un autre domaine de la biologie à finalité prédictive : la biologie des systèmes.

6.2. Les apports potentiels de la biologie des systèmes

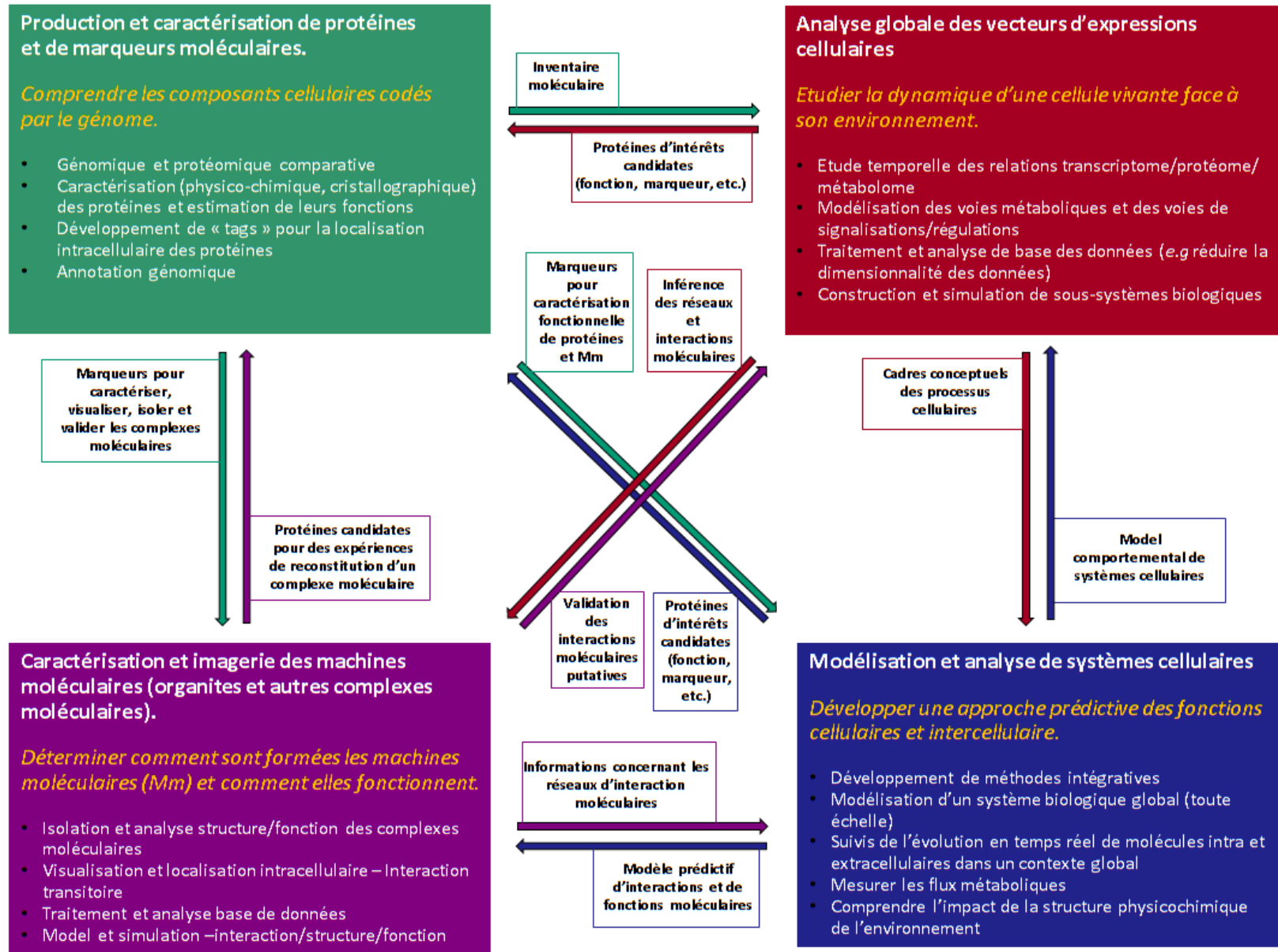
La biologie des systèmes entend comprendre, dans le temps et l'espace, les interactions entre les structures et les processus biologiques qui conduisent à l'émergence des fonctions biologiques d'une cellule. Cela a mené au développement de nombreux outils (les technologies « omiques ») permettant d'intégrer un maximum d'informations sur la cellule et la dynamique de ses constituants tandis que l'on perturbe pas à pas son environnement afin de mettre en évidence la logique derrière la superposition et le passage d'un réseau génétique/métabolique à l'autre. La Figure 6 résume les compétences et les interactions entre compétences nécessaires à l'élaboration de modèles systémiques.

L'un des problèmes de la biologie synthétique est la vision d'ensemble du système, de sa logique de fonctionnement et des interactions entre les différentes parties qui le constituent. A l'image d'un programme informatique, nous visualisons seulement la valeur de sortie et non le cheminement du programme. L'une des clés de voûte du fonctionnement d'un circuit génétique, c'est la dynamique d'activation de ses promoteurs. Un changement dans le niveau ou l'intensité d'expression d'un gène peut engendrer un changement du niveau d'interaction des systèmes protéiques avec le réseau global et conduire le système vers un tout autre équilibre. Pour un biologiste synthétique, cela mène à un biais d'interprétation des signaux de sortie car le contexte génétique (artificiel ou naturel) dans lequel s'exprime son circuit n'est plus maîtrisé (*e.g* apparition de bruits de fond).

C'est la connaissance de ce contexte génétique qui permettra de définir le domaine d'existence et la validité d'une réponse cellulaire et d'une manière générale, de définir l'état d'un biosenseur bactérien dans un environnement donné.

La biologie des systèmes permet effectivement de rendre compte de cette dynamique mais la mesure entraîne systématiquement la destruction de la cellule (ou de la population de cellules) et donc la non continuité d'observation d'un seul et même système.

Figure 6 : Schéma fonctionnel décrivant les types d'informations nécessaires à l'élaboration d'un modèle systémique et soulignant l'importance de l'interaction de certaines branches de la biologie pour leur production.



7. Orientation et objectifs du travail de thèse

L'objectif général de ce travail était d'identifier et de modéliser la réponse fonctionnelle et adaptative de microorganismes à leur environnement minéral par le développement de biosenseurs bactériens afin d'améliorer le formalisme de nos connaissances sur les grands processus (libération d'éléments minéraux, transformation de la matière organique) se déroulant au sein des écosystèmes terrestres. Encore aujourd'hui, les variations spatio-temporelles, qualitatives et quantitatives à différentes échelles des interactions biotiques-abiotiques se déroulant au sein d'un système bactérie-minéral sont très peu documentées. L'une des principales difficultés rencontrées étant d'identifier et de formaliser les modalités d'interaction entre l'inerte et le vivant en fonction des différentes contraintes externes (physico-chimie du milieu) ou internes (activité et diversité microbienne, réactivité minérale).

Les recherches menées sur l'adhésion de bactéries sur différents types de supports ont démontré la forte sensibilité des cellules à la texture des surfaces : structure (géométrie, hétérogénéité), composition chimique (configuration moléculaire, ionisation...) (Rizzello *et al.* 2012 ; Díaz *et al.* 2007 ; Rizzello. *et al.* 2011; Mitik-Dineva *et al.* 2008-2009). Par exemple, Rizzello *et al.* (2012) ont observé d'importantes variations morphologiques, génomiques et protéomiques dans des populations d'*E. coli* se développant sur une surface d'or lisse ou présentant des irrégularités nanométriques. Une autre équipe, Diaz *et al.* (2007), observa des différences comportementales chez *Pseudomonas fluorescens* au contact de différentes surfaces métalliques, corrélables à leur variations topologiques de ces surfaces. Les microorganismes « sentent » leur environnement et interagissent avec ce dernier en ajustant l'expression de certains gènes. Ainsi, la modification génétique ad-hoc d'un microorganisme permettrait de rendre compte des relations dynamiques (du dialogue) liant son métabolisme à l'état structurel (physique et chimique) de son environnement immédiat, qu'il soit solide (minéral) ou liquide (solution).

Dans son approche méthodologique, ce travail de thèse se trouve à l'interface de la biologie synthétique et de la biologie des systèmes. Sa réalisation reposait sur trois objectifs clefs :

- L'élaboration de systèmes rapporteurs multicolores assurant l'observabilité d'un réseau ou d'un ensemble de promoteurs d'intérêt, et générant des données hyperspectrales variées.
- Le développement d'une approche systémique reposant sur l'analyse multilinéaire de données hyperspectrales multivariées afin d'intégrer l'ensemble des signaux rapporteurs et spectroscopiques d'un système et d'estimer conjointement leur réponse en fonction de conditions environnementales contrôlées.
- L'identification de gènes d'intérêts bactériens caractérisant les interactions au sein d'un système bactérie-minéral.

Le travail s'articule en trois actions de recherche complémentaires qui constituent les trois chapitres expérimentaux de ce manuscrit.

Le premier chapitre présente l'approche générale et la méthode centrale du travail : l'estimation synchrone des réponses de promoteurs dans un mélange de biosenseurs fluorescents multicolores (fonctionnant comme des circuits logiques Et/Ou). Cette estimation repose sur l'utilisation conjointe de la spectrométrie synchrone de fluorescence et de méthodes de décomposition polyadique (ou multi-linéaire). A partir de souches d'*E. coli* produisant de manière constitutive des protéines fluorescentes de couleurs variées, le potentiel et les limites de la méthode sont caractérisés sur des mélanges synthétiques de ces systèmes rapporteurs. La méthode est ensuite validée par l'étude de l'expression de deux gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, *bfrB* et *pvdA*, chez la souche modèle *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

La seconde partie présente la mise en application directe de la méthode à l'une des problématiques majeures de la biogéochimie des sols : l'identification des facteurs clés

contrôlant les processus de bio-altération des minéraux ou la biodisponibilité d'oligo-éléments essentiels comme le fer. Ce travail a été réalisé à partir de l'analyse multilinéaire des signaux spectroscopiques (fluorescence, absorbance) mesurés sur un système biosenseur-minéral modèle, associant la bactérie productrice de sidérophores *P. aeruginosa* PAO1 et un minéral argileux riche en fer, la nontronite.

La troisième partie présente la recherche de gènes « sensibles » aux minéraux, réalisée à partir d'une banque de promoteurs d'*E.coli* K12. Cette collection issue des travaux de Zaslaver *et al.* (2006) a permis de tester l'activité de 1870 promoteurs dans des conditions expérimentales bien définies, avec ou sans minéral (nontronite), avec ou sans contact direct avec les particules minérales. L'objectif était d'identifier des promoteurs plus ou moins activés en présence de minéraux, afin de construire par homologie des biosenseurs capables de percevoir les minéraux à partir de bactéries Gram - isolés de sols et dont les compétences pour l'altération minérale sont répertoriés au laboratoire.

Bibliographie

- Ahn, J. M., Mitchell, R. J., & Gu, M. B. (2004). Detection and classification of oxidative damaging stresses using recombinant bioluminescent bacteria harboring *sodA::pqi::* and *katG::luxCDABE* fusions. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6), 540-544.
- Alpat, Ş., Alpat, S. K., Çadırcı, B. H., Yaşa, İ., & Telefoncu, A. (2008). A novel microbial biosensor based on *Circinella* sp. modified carbon paste electrode and its voltammetric application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(1), 175-181.
- Álvarez-González, M. I., Saidman, S. B., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., & Tuñón-Blanco, P. (2000). Electrocatalytic detection of NADH and glycerol by NAD⁺-modified carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 72(3), 520-527.
- Andreou, V. G., & Clonis, Y. D. (2002). Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine. *Analytica Chimica Acta*, 460(2), 151-161.
- Arif, M., Setford, S. J., Burton, K. S., & Tothill, I. E. (2002). L-Malic acid biosensor for field-based evaluation of apple, potato and tomato horticultural produce. *Analyst*, 127(1), 104-108.
- Baumann, B., & van der Meer, J. R. (2007). Analysis of bioavailable arsenic in rice with whole cell living bioreporter bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2115-2120.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2252-2256.
- Bobacka, J., Ivaska, A., & Lewenstam, A. (2008). Potentiometric ion sensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 329-351.
- Boldt, T.S.; Sorensen, J., Karlson, U., Molin, S., Ramos, C. (2004) Combined use of different Gfp reporters for monitoring single-cell activity of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of Alfalfa. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 139-148.
- Borisov SM, Wolfbeis OS (2008) Optical biosensors, *Chemical Reviews* 108, 423–461.
- Brandt, K.K., Holm, P.E., Nybroe, O. (2006) Bioavailability and toxicity of soil particle-associated copper as determined by two bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* biosensor strains. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1738-1741.
- Colapicchioni, C., Barbaro, A., Porcelli, F., & Giannini I. (1991) Immunoenzymatic assay using CHEMFET devices. *Sensors and Actuators B*, 4, 245.
- Canton, B., A. Labno, and D. Endy. 2008. Refinement and standarization of synthetic biological parts and devices. *Nature Biotechnology* 26(7):787-793.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76(9), 4530-4533.
- Choi, J. W., Kim, Y. K., Song, S. Y., Lee, I. H., & Lee, W. H. (2003). Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(12), 1461-1466.

- Chouteau, C., Dzyadevych, S., Durrieu, C., & Chovelon, J. M. (2005). A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(2), 273-281.
- Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 100(7), 2705-2738.
- De Las Heras, A., Carreño, C. A., & De Lorenzo, V. (2008). Stable implantation of orthogonal sensor circuits in Gram-negative bacteria for environmental release. *Environmental Microbiology*, 10(12), 3305-3316.
- Devine, J. H., Kutuzova, G. D., Green, V. A., Ugarova, N. N., & Baldwin, T. O. (1993). Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1173(2), 121-132.
- Díaz, C., Cortizo, M. C., Schilardi, P. L., Saravia, S. G. G. D., & Mele, M. A. F. L. D. (2007). Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion. *Materials Research*, 10(1), 11-14.
- Diesel, E., Schreiber, M., van der Meer, J. (2009) Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 394, 687-693.
- Ding, L., Du, D., Zhang, X., & Ju, H. (2008). Trends in cell-based electrochemical biosensors. *Current Medicinal Chemistry*, 15(30), 3160-3170.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauß, U., Guterl, J. K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W. & Jaeger, K. E. (2007). Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nature Biotechnology*, 25(4), 443-445.
- D'souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 337-353.
- Ellington, A. D. (2011, November). The genome as the unit of engineering. In *The Science and Applications of Synthetic and Systems Biology: Workshop Summary* (p. 150). National Academies Press.
- Engbrecht, J., Simon, M., & Silverman, M. (1985). Measuring gene expression with light. *Science*, 227(4692), 1345-1347
- Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., & Sun, Y. (2008). Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620(1), 8-26.
- Fesenko, D. O., Nasedkina, T. V., Chudinov, A. V., Prokopenko, D. V., Yurasov, R. A., & Zasedatelev, A. S. (2005). Alginate gel biochip for real-time monitoring of intracellular processes in bacterial and yeast cells. *Molecular Biology*, 39(1), 84-89.
- French, C. E., Haseloff, J., & Ajioka, J. (2011, November). SYNTHETIC BIOLOGY AND THE ART OF BIOSENSOR DESIGN. In *The Science and Applications of Synthetic and Systems Biology: Workshop Summary* (p. 178). National Academies Press.
- Fujimoto, H., Wakabayashi, M., Yamashiro, H., Maeda, I., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Miyasaka, H., Yagi, K. (2006) Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*: *Rhodovulum sulfidophilum* as an arsenite biosensor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 332-338.
- Galvão, T. C., Mencía, M., & De Lorenzo, V. (2007). Emergence of novel functions in transcriptional regulators by regression to stem protein types. *Molecular Microbiology*, 65(4), 907-919.

- Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., van der Lelie, D, Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Porteous Moore, F., Moore, E.R.B., Campbell, C.D., Ryan, D., Dowling, D.N. 2004 Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 109-118.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458.
- Guedri, H., & Durrieu, C. (2008). A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring. *Microchimica Acta*, 163(3-4), 179-184.
- Hakovirta, J., Reunanen, J., & Saris, P. E. J. (2006). Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1001-1005.
- Harms, H., Wells, M. C., & van der Meer, J. R. (2006). Whole-cell living biosensors—are they ready for environmental application?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 273-280.
- Ivask, A., Rõlova, T., & Kahru, A. (2009). A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC biotechnology*, 9(1), 41.
- J. M. van Emon, *Immunoassay and Other Bioanalytical Methods*, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2007.
- King, J. M. H., DiGrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P. & Sayler, G. A. (1990) Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*, 249(4970), 778-781.
- Kissinger, P.T. & Heineman, W.R. (eds). (1996), *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York.
- Kumar, S., Kundu, S., Pakshirajan, K., & Dasu, V. V. (2008). Cephalosporins determination with a novel microbial biosensor based on permeabilized *Pseudomonas aeruginosa* whole cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), 653-664.
- Kumlanghan, A., Liu, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Mattiasson, B. (2007). Microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), 2939-2944.
- Lee, J. H., Mitchell, R. J., Kim, B. C., Cullen, D. C., & Gu, M. B. (2005). A cell array biosensor for environmental toxicity analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 500-507.
- Lee, S. Y., Choi, J. H., & Xu, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology*, 21(1), 45-52.
- Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 568(1), 200-210.
- Lei, Y., Mulchandani, A., & Chen, W. (2005). Improved degradation of organophosphorus nerve agents and p-nitrophenol by *Pseudomonas putida* JS444 with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology Progress*, 21(3), 678-681.
- Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., & Mulchandani, A. (2007). Biosensor for direct determination of fenitrothion and EPN using recombinant *Pseudomonas putida* JS444 with surface-expressed organophosphorous hydrolase. 2. Modified carbon paste electrode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(3), 243-250.
- Lei, Y., Mulchandani, P., Wang, J., Chen, W., & Mulchandani, A. (2005). Highly sensitive and selective amperometric microbial biosensor for direct determination of p-nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents. *Environmental Science & Technology*, 39(22), 8853-8857.

- Lejon D., Martins, J., Leveque, J., Spanini, L., Pascault, N., Landry, M., Milloux, M., Nowak, V., Chaussod, R., Ranjard, L. (2008) Copper dynamics and impacts on microbial communities in soils of variable organic status. *Environmental Science & Technology*.42, 2819-2825.
- Leveau, J. H., & Lindow, S. E. (2001). Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(6), 3446-3453.
- Liu, X., Germaine, K., Ryan, D., Dowling, D.N. Development of a GFP-based biosensor for detecting the bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 2007, 15, 261-268
- Loening, A. M., Wu, A. M., & Gambhir, S. S. (2007). Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. *Nature Methods*, 4(8), 641-643.
- Maines, A., Prodromidis, M. I., Tzouwara-Karayanni, S. M., Karayannis, M. I., Ashworth, D., & Vadgama, P. (2000). An enzyme electrode for extended linearity citrate measurements based on modified polymeric membranes. *Electroanalysis*, 12(14), 1118-1123.
- Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological reviews*, 55(1), 123-142.
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Stoddart, P. R., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2008, February). Nano-structured surfaces control bacterial attachment. In *Nanoscience and Nanotechnology, 2008. ICONN 2008. International Conference on* (pp. 113-116). IEEE.
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Truong, V. K., Stoddart, P., Malherbe, F., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness. *Current Microbiology*, 58(3), 268-273.
- Mizutani, F., Hirata, Y., Yabuki, S., & Iijima, S. (2003). Flow injection analysis of acetic acid in food samples by using trienzyme/poly (dimethylsiloxane)-bilayer membrane-based electrode as the detector. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 91(1), 195-198.
- Mohanty, S. P., & Kougiannos, E. (2006). Biosensors: a tutorial review. *Potentials, IEEE*, 25(2), 35-40.
- Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskow, Molin, S. (1998) In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 721-732.
- Monošík, R., Stredánský, M., & Šturdík, E. (2012). Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109-120.
- Mulbry, W. W., & Karns, J. S. (1989). Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6740-6746.
- Mulchandani, P., Hangarter, C. M., Lei, Y., Chen, W., & Mulchandani, A. (2005). Amperometric microbial biosensor for p-nitrophenol using *Moraxella* sp. modified carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(3), 523-527.
- Nakamura, S. I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I., & Sugimoto, K. (1987). SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutation Research Letters*, 192(4), 239-246.
- Newman, J. D., & Turner, A. P. (2005). Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2435-2453.

- Nishino, S. F., & Spain, J. C. (1993). Cell density-dependent adaptation of *Pseudomonas putida* to biodegradation of p-nitrophenol. *Environmental science & technology*, 27(3), 489-494.
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2006). A flow cytometry-optimized assay using an SOS–green fluorescent protein (SOS–GFP) whole-cell biosensor for the detection of genotoxins in complex environments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603(2), 164-172.
- Pang, L., Li, J., Jiang, J., Shen, G., & Yu, R. (2006). DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach. *Analytical biochemistry*, 358(1), 99-103.
- Pereira, A. C., Aguiar, M. R., Kisner, A., Macedo, D. V., & Kubota, L. T. (2007). Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 124(1), 269-276.
- Phoenix, P., Keane, A., Patel, A., Bergeron, H., Ghoshal, S., & Lau, P. C. K. (2003). Characterization of a new solvent-responsive gene locus in *Pseudomonas putida* F1 and its functionalization as a versatile biosensor. *Environmental microbiology*, 5(12), 1309-1327.
- Prasher, D. C. (1995). Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*, 11(8), 320-323.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(19), 5971-5975.
- Rajan Premkumar, J., Rosen, R., Belkin, S., & Lev, O. (2002). Sol–gel luminescence biosensors: Encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films. *Analytica Chimica Acta*, 462(1), 11-23.
- Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1997). Sensing antimonite and arsenite at the subattomole level with genetically engineered bioluminescent bacteria. *Analytical chemistry*, 69(16), 3380-3384.
- Rasmussen, L. D., Turner, R. R., & Barkay, T. (1997). Cell-density-dependent sensitivity of a mer-lux bioassay. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3291-3293.
- Rizzello, L., Galeone, A., Vecchio, G., Brunetti, V., Sabella, S., & Pompa, P. P. (2012). Molecular response of *Escherichia coli* adhering onto nanoscale topography. *Nanoscale research letters*, 7(1), 1-8.
- Rizzello, L., Sorce, B., Sabella, S., Vecchio, G., Galeone, A., Brunetti and V. Pompa, P. P. (2011). Impact of nanoscale topography on genomics and proteomics of adherent bacteria. *ACS nano*, 5(3), 1865-1876.
- Ron, E. Z. (2007). Biosensing environmental pollution. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 252-256.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747-1763.
- Sacchi, S., Pollegioni, L., Pilone, M. S., & Rossetti, C. (1998). Determination of D-amino acids using a D-amino acid oxidase biosensor with spectrophotometric and potentiometric detection. *Biotechnology techniques*, 12(2), 149-153.
- Sarhan, M. A. (2011). Ice nucleation protein as a bacterial surface display protein. *Archives of Biological Sciences*, 63(4), 943-948.
- Sassolas, A., Prieto-Simón, B., & Marty, J. L. (2012). Biosensors for pesticide detection: New trends. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3(3), 210-232.

- Sauro, H. (2011). Synthetic and Systems Biology. Design and complexity. Forum on Microbial Threats, Institute of Medicine, Washington, DC.
- Schell, M. A., & Wender, P. E. (1986). Identification of the nahR gene product and nucleotide sequences required for its activation of the sal operon. *Journal of bacteriology*, 166(1), 9-14.
- Schreiter, P. P. Y., Gillor, O., Post, A., Belkin, S., Schmid, R. D., & Bachmann, T. T. (2001). Monitoring of phosphorus bioavailability in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(9), 811-818.
- Selifonova, O., Burlage, R., & Barkay, T. (1993). Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg (II) in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 59(9), 3083-3090.
- Serdar, C. M., Murdock, D. C., & Rohde, M. F. (1989). Parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta* MG: subcloning, complete nucleotide sequence, and expression of the mature portion of the enzyme in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 7(11), 1151-1155.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), 1567-1572.
- Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W., & Tsien, R. Y. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature methods*, 5(6), 545-551.
- Sheu, J. T., Chen, C. C., Chang, K. S., & Li, Y. K. (2008). A possibility of detection of the non-charge based analytes using ultra-thin body field-effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(12), 1883-1886.
- Shimazu, M., Mulchandani, A., & Chen, W. (2001). Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and bioengineering*, 76(4), 318-324.
- Shingler, V., & Moore, T. (1994). Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600. *Journal of bacteriology*, 176(6), 1555-1560.
- Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science*, 324(5928), 804-807.
- Sidwell, J. S., & Rechnitz, G. A. (1985). "Bananatrod"—An electrochemical biosensor for dompamine. *Biotechnology letters*, 7(6), 419-422.
- Smutok, O., Ngounou, B., Pavlishko, H., Gayda, G., Gonchar, M., & Schuhmann, W. (2006). A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113(2), 590-598.
- Sticher, P., Jaspers, M. C., Stemmler, K., Harms, H., Zehnder, A. J., & Van Der Meer, J. R. (1997). Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 4053-4060.
- Stoytcheva, M., Zlatev, R., Valdez, B., Magnin, J. P., & Velkova, Z. (2006). Electrochemical sensor based on *Arthrobacter globiformis* for cholinesterase activity determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(1), 1-9.

- Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788-1799.
- Tag, K., Riedel, K., Bauer, H. J., Hanke, G., Baronian, K. H., & Kunze, G. (2007). Amperometric detection of Cu²⁺ by yeast biosensors using flow injection analysis (FIA). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 122(2), 403-409.
- Tang, H., Chen, J., Nie, L., Kuang, Y., & Yao, S (2007). A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 1061-1067.
- Tani, H., Maehana, K., & Kamidate, T. (2004). Chip-based bioassay using bacterial sensor strains immobilized in three-dimensional microfluidic network. *Analytical chemistry*, 76(22), 6693-6697.
- Tani, H., Maehana, K., & Kamidate, T. (2007). On-chip bioassay using immobilized sensing bacteria in three-dimensional microfluidic network. In *Microchip-Based Assay Systems* (pp. 37-52). Humana Press.
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., & Virta, M. (1997). Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Applied and environmental microbiology*, 63(11), 4456-4461.
- Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., & Virta, M. (1998). Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(9), 931-938.
- Taylor, C. J., Bain, L. A., Richardson, D. J., Spiro, S., & Russell, D. A. (2004). Construction of a whole-cell gene reporter for the fluorescent bioassay of nitrate. *Analytical biochemistry*, 328(1), 60-66.
- Tecon, R., Beggah, S., Czechowska, K., Sentchilo, V., Chronopoulou, P. M., McGenity, T. J., & van der Meer, J. R. (2009). Development of a multistrain bacterial bioreporter platform for the monitoring of hydrocarbon contaminants in marine environments. *Environmental science & technology*, 44(3), 1049-1055.
- Timur, S., Anik, U., Odaci, D., & Gorton, L. (2007). Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 9(7), 1810-1815.
- Trivedi, U. B., Lakshminarayana, D., Kothari, I. L., Patel, P. B., & Panchal, C. J. (2009). Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136(1), 45-51.
- Turner, A. P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196.
- Turner, A.P.F., Karube, I. & Wilson, G.S. (eds.) (1992). *Biosensors: Fundamentals and Applications*, p. 20, Mir Publishers, Moscow, Russia.
- Turner, K., Xu, S., Pasini, P., Deo, S., Bachas, L., & Daunert, S. (2007). Hydroxylated polychlorinated biphenyl detection based on a genetically engineered bioluminescent whole-cell sensing system. *Analytical chemistry*, 79(15), 5740-5745.
- Van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 511-522.
- Van Dyk, T. K., Majarian, W. R., Konstantinov, K. B., Young, R. M., Dhurjati, P. S., & Larossa, R. A. (1994). Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Applied and environmental microbiology*, 60(5), 1414-1420.

- Velasco-Garcia, M. N. (2009, February). Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 20, No. 1, pp. 27-33). Academic Press.
- Vidal, J. C., Espuelas, J., Garcia-Ruiz, E., & Castillo, J. R. (2004). Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-Blue layers helped with self-assembled monolayers. *Talanta*, 64(3), 655-664.
- Virta, M., Lampinen, J., & Karp, M. (1995). A luminescence-based mercury biosensor. *Analytical Chemistry*, 67(3), 667-669.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2566-2571.
- Wang, J. (1985). *Stripping analysis: principles, instrumentation and applications*, VCH Publishers, Deerfield Beach.
- Wang, B., Barahona, M., & Buck, M. (2012). A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals. *Biosensors and Bioelectronics*. 40(1) 368-376.
- Wang, J. (2001). Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis*, 13(12), 983.
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 108(2), 814-825.
- Werlen, C., Jaspers, M. C., & van der Meer, J. R. (2004). Measurement of biologically available naphthalene in gas and aqueous phases by use of a *Pseudomonas putida* biosensor. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 43-51.
- 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. *Applied and environmental microbiology*, 64(3), 1006-1012.
- Wood, K. V., Lam, Y. A., Seliger, H. H., & McElroy, W. D. (1989). Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science*, 244(4905), 700-702.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N. & Givskov, M. (2000). Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 146(10), 2481-2493.
- Yagi, K. (2007). Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(6), 1251-1258.
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G. & Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature methods*, 3(8), 623-628.

Matériel et Méthodes

Pour l'analyse des réponses spectroscopiques à l'échelle macroscopique ou microscopique de biosenseurs répondant aux minéraux au sein de l'ANR HÆSPRI (ANR-09-BLAN-0336), un effort méthodologique particulier et innovant a été réalisé pour associer des concepts et méthodes provenant de différentes disciplines : automatique et mathématiques appliquées, spectrochimie, géomicrobiologie, biochimie moléculaire. Par exemple, les méthodes et algorithmes de décomposition polyadique canonique CP (Candecomp/Parafac) ont été testés sur les signaux de fluorescence émis par de nouveaux biosenseurs bactériens à cellule entière développés dans le cadre de ce travail. Les modalités d'expression chez les bactéries à Gram négatif (genre *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shewanella*) de nouvelles protéines fluorescentes (FP) connues chez les eucaryotes ont été évaluées pour le développement de biosenseurs multicolores. En adaptant les biais de codons et via des vecteurs multi-copies et à large spectre d'hôte, une dizaine de FP de couleurs différentes peuvent être employées dans la conception de biosenseurs bactériens multicolores, réagissant à des stimulus environnementaux. Ainsi, l'estimation de la réponse de biosenseurs réagissant au fer (III), libre ou piégé dans des gels de silice dopés par des particules de nontronite, a nécessité des constructions génétiques. Une partie du développement méthodologique a aussi concerné l'exploitation des spectres synchrones de fluorescence pour l'acquisition et l'analyse des signaux émis par ces suspensions de biosenseurs fluorescents. Cette approche originale par un balayage simultané en excitation et émission permettent d'accroître sensiblement la détectabilité et la séparabilité des sources fluorescentes connues (protéines fluorescentes) et inconnues (auto-fluorescence intrinsèque), quels que soient les optimums d'excitation et d'émission des rapporteurs employés.

1. Souches bactériennes hôtes et construction des biosenseurs

Plusieurs souches modèles d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ont été employées pour :

- Évaluer les possibilités d'expression de nouvelles protéines fluorescentes, variants spectraux de GFP et de DsRed.
- la construction de biosenseurs sensibles au fer disponible en solution ou contenu dans des colloïdes minéraux ferrifères (nontronite)
- tester les possibilités de séparation et d'identification des algorithmes de traitements des signaux CP (Cf Chapitre 1).

Dans ce travail, tous les protocoles de biologie moléculaire employés pour le design de nouveaux biosenseurs proviennent de protocoles standard décrits par Sambrook *et al.* (2001). Seule la technique d'électroporation employée pour transformer la souche *P.aeruginosa* PAO1 provient des travaux de Choi *et al.* (2006).

1.1. Souches bactériennes

La souche *Escherichia coli* K-12 MG1665 a été utilisée pour la recherche de gènes sensibles aux phases minérales organisées (gel de silice, suspension colloïdale) via une collection de promoteurs présentée un peu plus loin.

La souche *Escherichia coli* K-12 TOP10 a été utilisée pour toutes les constructions de plasmides développés dans cette étude et pour l'ensemble des tests visant à valider et caractériser la méthode multiparamétrique de séparation de sources. (Cf Article 2)

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, sauvage (PAO1 WT), et déficiente pour la synthèse des sidérophores pyoverdine ou pyochéline (PAO1 $\Delta pvdA$; PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$) ont été utilisées pour l'étude des processus d'altération des particules nontronites.

En complément des souches de *P. putida* (KT 2440) et *Shewanella oneidensis* (MR1) ont permis d'évaluer les modalités d'expression des nouvelles protéines fluorescentes sélectionnées dans d'autres bactéries à Gram négatif.

L'origine et les caractéristiques des souches employées sont résumées dans le Tableau 6, présenté ci-dessous.

Tableau 6 : Origines et caractéristiques des souches hôtes utilisées dans ce travail.

Souches	Génotype - Caractéristiques	Utilisation	Références
<i>Escherichia coli</i> K-12			
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL(Str^R)</i> <i>endA1</i> λ -	Développement de marquage constitutif Biosenseurs pour la validation du modèle CP	Invitrogen
MG1665	F- λ : <i>ilvG</i> <i>rfb-50</i> <i>rph-1</i> – Souche hôte de la banque de promoteurs d' <i>E. coli</i> fusionnés à <i>gfp</i> .		Zaslaver et al. 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
PAO1	Type sauvage		ATCC 15692
PAO1 $\Delta pvdA$	Mutant déficient dans la production de pyoverdine	Biosenseurs pour l'étude de la disponibilité du Fer(III) et l'altérabilité de smectites ferrifères (Nontronite)	Banin et al., 2005
PAO1 $\Delta pvdD$ $\Delta pchEF$	Mutant déficient dans la production de pyoverdine et de pyochéline.		Ghysels et al., 2004
<i>Pseudomonas putida</i>			
KT2440	Type Sauvage		DSMZ 6125
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1			
MR-1	Type Sauvage		ATCC 70050

1.2. Vecteurs plasmidiques

Afin de développer des biosenseurs à partir de souches bactériennes isolées de sols ou d'écosystèmes perturbés, il est apparu intéressant de déployer les constructions sur des vecteurs polyvalents. Ainsi, les plasmides pPROBE'-GFP[LVA] (Figure 7) et pPROBE-NT' (Miller et al. 2000) ont servi de vecteur de base pour la majorité des constructions plasmidiques réalisées dans ce travail. Ce sont des plasmides multi-copies à large spectre d'hôtes et spécifiques des bactéries à Gram négatifs.

La construction de la série de plasmides pPR-lac, permettant l'expression de différentes protéines fluorescentes sous contrôle d'un promoteur *lac* modifié ($P_{A1/04/03}$), est détaillée en annexe de l'article 2 (Parrello et al., soumis). Brièvement, ces constructions ont été réalisées en remplaçant le gène *gfp* du plasmide pPROBE'-GFP[LVA] par les fragments d'ADN codant les protéines fluorescentes, obtenus soit (i) par amplification PCR à partir de plasmides fournis par

La construction s'est déroulée en trois étapes :

- Insertion du gène rapporteur au sein de pJBA24 entre les sites de restriction XbaI et HindIII
- Excision du promoteur constitutif P_{A1/04/03} et insertion du promoteur bfrB en amont du gène rapporteur entre les sites de restrictions KpnI et XbaI
- Insertion de la cassette bfrB-rapporteur (cassette NotI) au sein du vecteur pUC18T-mini-Tn7T-Gm au niveau du site de restriction StuI

Les plasmides utilisés et construits au cours de cette étude sont listés dans le tableau 2.

Tableau 7 : Origines et caractéristiques des plasmides utilisés

Plasmides	Caractéristiques ^(a)	Références
Vecteurs		
pPROBE'-GFP[LVA]	Plasmide à faible nombre de copies, à large spectre d'hôtes Gram- ; Km ^r	Miller et al. (2000)
pPROBE-NT'	Plasmide à large spectre d'hôtes Gram- : promoteur <i>gfp</i> ; Km ^r	Miller et al. (2000)
pJBA24		
pJBA28	Source du promoteur <i>lac</i> P _{A1/04/03} ; Ap ^r ; Km ^r	Andersen et al. (1998)
pUC18T-mini-Tn7T-Gm	Transposon mini-T7 ; Ap ^r Gm ^r	Choi et al.
Plasmides exprimant des protéines fluorescentes sous contrôle du promoteur <i>lac</i>		
pPROBE-NT'lac	Derivé de pPROBE-NT' - portant une fusion P _{A1/04/03} :: <i>gfp</i> ; Km ^r	Parrello et al., soumis (article 2)
pPRlac-Y538	pPRY538 portant une fusion P _{A1/04/03} :: <i>turboYFP</i> ; Km ^r	
pPRlac-O561	pPRO561 portant une fusion P _{A1/04/03} :: <i>E2-orange</i> ; Km ^r	
pPRlac-X591	pPRX591 portant une fusion P _{A1/04/03} :: <i>dsRed-Express2</i> ; Km ^r	
Plasmides exprimant des protéines fluorescentes sous contrôle des promoteurs <i>bfrB</i> et <i>pvdA</i>		
pPR'-bfrB-E ₂ Orange	pPRO561 portant une fusion <i>bfrB</i> :: <i>E2-orange</i> ; Km ^r	Cette étude
pPR'-pvdA-dsRedExpress2	pPRX591 portant une fusion <i>pvdA</i> :: <i>dsRed-Express2</i> ; Km ^r	
MiniTn7-bfrB-mCherry	fusion <i>bfrB</i> :: <i>mCherry</i> clonée dans pUC18TminiTn7T ; Gm ^r	Cette étude
Mini-CTX-bfrB-GFP	fusion <i>bfrB</i> :: <i>gfp</i> clonée dans miniCTX-lacZ ; Ap ^r ; Tc ^r	Billard et al., non publié
Mini-CTX-pvdA-GFP	fusion <i>pvdA</i> :: <i>gfp</i> clonée dans miniCTX-lacZ ; Ap ^r ; Tc ^r	Banin et al., 2005
Mini-CTX-bfrB-EYFP	fusion <i>bfrB</i> :: <i>eyfp</i> clonée dans miniCTX-lacZ ; Ap ^r ; Tc ^r	Cette étude
Mini-CTX-pvdA-EYFP	fusion <i>pvdA</i> :: <i>eyfp</i> clonée dans miniCTX-lacZ ; Ap ^r ; Tc ^r	Cette étude

(a) Km^r : résistance à la kanamycine ; Ap^r : Résistance à l'ampicilline ; Gm^r : résistance à la gentamycine, Tc^r : résistance à la tétracycline.

Les plasmides pPROBE-NT'lac, pPRlac-Y538, pPRlac-O561 et pPRlac-X591 listés dans le Tableau 7 ont été introduits par transformation dans *E. coli* TOP10 afin d'obtenir une expression constitutive respectivement de GFP, YFP, E2-Orange et DsRed-Express2.

Les souches obtenues suite à l'introduction des constructions exprimant des fusions pvdA- et bfrB-rapporteur fluorescent chez *P. aeruginosa* sont présentées dans le Tableau 8.

1.3. Techniques générales de biologie moléculaire

L'ensemble des techniques de biologie moléculaire utilisées au cours de cette étude (techniques de PCR, purification de fragments d'ADN, extraction et purification d'ADN plasmidique, restriction enzymatique, traitement à la T4 DNA polymérase, déphosphorylation, ligation, préparation de cellules compétentes et transformation d'*E. coli*) ont été réalisées selon des protocoles standards (Sambrook et al. 2001). Les enzymes et kits de biologie moléculaires ont été utilisés en suivant les recommandations des fournisseurs.

Tableau 8 : Souches de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) utilisées comme biosenseur du fer

Souches / Plasmides	Génotype	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		
Fusion dans le plasmide pPROBE-NT'lac Plasmide dérivé de pPROBE-NT', production de gfp sous contrôle du promoteur P_{A1104/03} Résistance Kmr	Fusion <i>bfrB::E2-Orange</i> dans PAO1 WT	LIEC01
	Fusion <i>pvdA::E2-Orange</i> dans PAO1 WT	LIEC02
	Fusion <i>bfrB::E2-Orange</i> PAO1 $\Delta pvdA$	LIEC03
	Fusion <i>pvdA::E2-Orange</i> dans PAO1 $\Delta pvdA$	LIEC04
	Fusion <i>bfrB::E2-Orange</i> dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$	LIEC05
	Fusion <i>pvdA::E2-Orange</i> dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$	LIEC06
	Fusion <i>bfrB::dsRed express2</i> dans PAO1 WT	LIEC07
	Fusion <i>pvdA::dsRed express2</i> dans PAO1 WT	LIEC08
	Fusion <i>bfrB::dsRed express2</i> dans PAO1 $\Delta pvdA$	LIEC09
	Fusion <i>pvdA::dsRed express2</i> dans PAO1 $\Delta pvdA$	LIEC10
	Fusion <i>bfrB::E2-Orange</i> dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$	LIEC05
	Fusion <i>pvdA::E2-Orange</i> dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$	LIEC06
	Fusion <i>bfrB::dsRed express2</i> dans PAO1 WT	LIEC07
	Fusion chromosomique	Fusion <i>bfrB::gfp</i> (CTX) dans PAO1
Fusion <i>bfrB::gfp</i> (CTX) dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$		LIM07
Fusion <i>pvdA::gfp</i> (CTX) dans PAO1		LIM08
Fusion <i>pvdA::gfp</i> (CTX) dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$		LIM10
Fusion <i>bfrB::eyfp</i> (CTX) dans PAO1		LIM11
Fusion <i>bfrB::eyfp</i> (CTX) dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$		LIM12
Fusion <i>pvdA::eyfp</i> (CTX) dans PAO1		LIM13
Fusion <i>pvdA::eyfp</i> (CTX) dans PAO1 $\Delta pvdD \Delta pchEF$		LIM14

La transformation d'*E. coli* par électroporation est réalisée après dialyse de produits de ligation contre de l'eau milliQ stérile pendant 1 h à température ambiante sur une membrane de 0,025 μm de porosité (Millipore). Cinquante microlitres de cellules électro-compétentes sont mélangés à 2 μL d'ADN puis électroporés (Gene Pulser® II Electroporation System (Bio-Rad)) dans des cuvettes de 2 mm de largeur inter-électrodes, en utilisant les paramètres suivants : 2,5 kV, 200 Ω et 25 μF . Immédiatement après le choc électrique, 1 mL de LB préchauffé à 37 °C est ajouté aux cellules qui sont ensuite incubées 1 h à 37 °C et 200 rpm. Les cellules transformées (1/10 et 1/4) sont ensuite étalées sur du milieu LB contenant l'antibiotique approprié.

Les souches *P. aeruginosa* PAO1 ont été transformées par électroporation selon la méthode de Choi et al. (2006).

Quelle que soit la méthode de transformation employée, l'identification des clones recombinants se fait par mesure de l'expression des protéines fluorescentes sous un éclairage monochromatique adapté (bleu ou vert), après étalement des recombinants sur boîte de Pétri contenant un milieu gélosé LB supplémenté avec de la gentamycine, de l'ampicilline ou de la kanamycine. Les clones fluorescents résistants sont cultivés sur un milieu LB liquide et conservés à -80 °C en aliquotes de 500 μL après ajout de glycérol 20%.

L'insertion du mini-Tn7 se produisant de façon conservée (25 nucléotides en aval du gène *glmS*), une analyse par PCR a permis de vérifier l'insertion du système rapporteur fluorescent au bon locus dans le chromosome de PAO1 selon le protocole décrit par Choi et al. (2007).

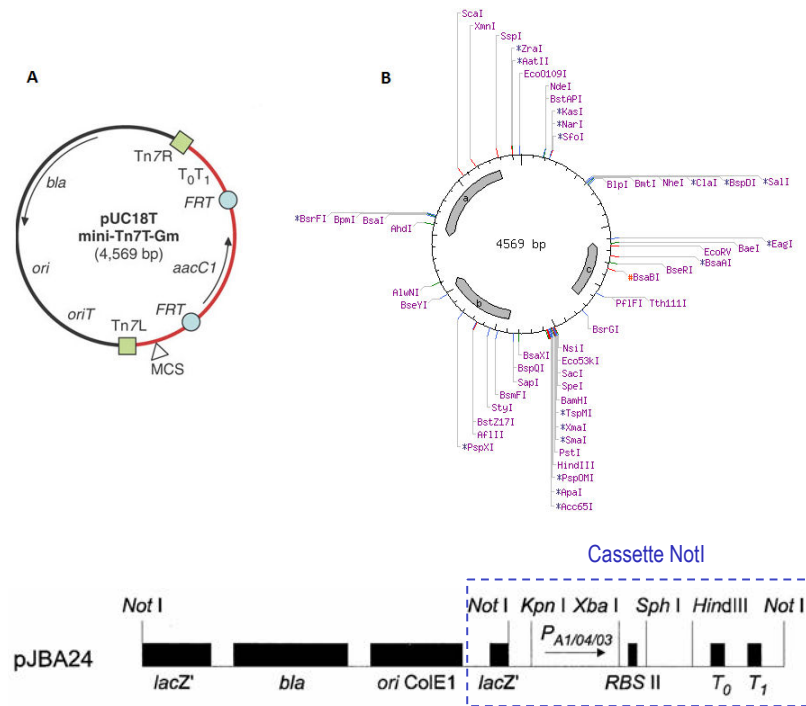


Figure 8 : Cartes génétique (A) et de restriction (B) du vecteur pUC18T-mini-Tn7T-Gm. Carte génétique de la cassette initiale NotI présente dans le vecteur pJBA24 et contenant le promoteur $P_{A1/04/03}$ (d'après Andersen et al. Appl. Environ. Microbiol. 1998 ; 64:2240-2246)

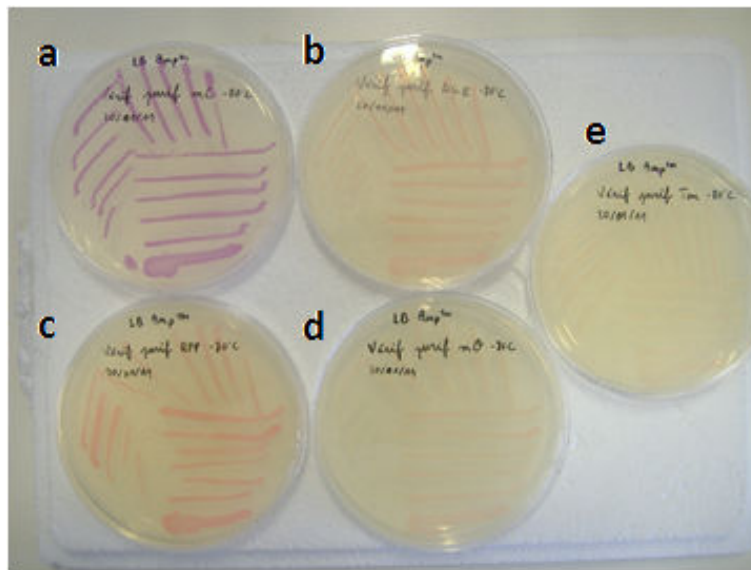


Figure 9 : Isolement de souches *E.coli* TOP10 exprimant de façon constitutive **a** : mCherry, **b** : DsRed, **c** : td-tomato, **d** : mOrange2, **e** : tag-RFP-T)

2. Les substrats minéraux : les colloïdes de Nontronite

Des suspensions de colloïdes argileux de textures différentes (géométrie et composition chimique) et disponibles au laboratoire LIEC furent utilisées au cours de cette étude. Elles ont été élaborés à partir de lots broyés et purifiés de deux nontronites naturelles NAu-1 et NAu-2 collectés dans une mine de graphite située dans la province de Uley (Australie). Les échantillons macroscopiques originaux des nontronites de Uley proviennent de la collection de minéraux argileux américaine, Clay Mineral Society (Purdue University, Indiana, USA). Les nontronites

NAu-1 et NAu-2 sont des argiles ferrifères « modèles » qui ont servi à de nombreuses recherches en géochimie et microbiologie concernant le devenir du fer dans des conditions physico-chimiques variées (oxydo-réduction) ou en présence de microorganismes (Stucki, 2002, Jaisi et al., 2005, 2007; Kim et al., 2005; O'Reilly et al., 2005; Zhang et al., 2007, Merola et MacGuire 2009, Esnault 2010, Oulkadi 2013).

2.1. Structure cristallographique de NAu-1 et NAu-2

Ce sont des phyllosilicates appartenant au groupe des smectites dioctaédriques riches en fer (III). Le fer trivalent est principalement situé dans le feuillet octaédrique comme l'indique les formulations structurales suivante (à maille complète) :

- NAu-1 : $(\text{Si}_{6.98} \text{Al}_{0.95} \text{Fe}_{0.07}) (\text{Fe}_{3.61} \text{Al}_{0.36} \text{Mg}_{0.04}) \text{O}_{20} (\text{OH})_4 \text{Na}_{1.05}$
- NAu-2 : $(\text{Si}_{7.55} \text{Al}_{0.16} \text{Fe}_{0.29}) (\text{Fe}_{3.54} \text{Al}_{0.34} \text{Mg}_{0.05}) \text{O}_{20} (\text{OH})_4 \text{Na}_{0.72}$

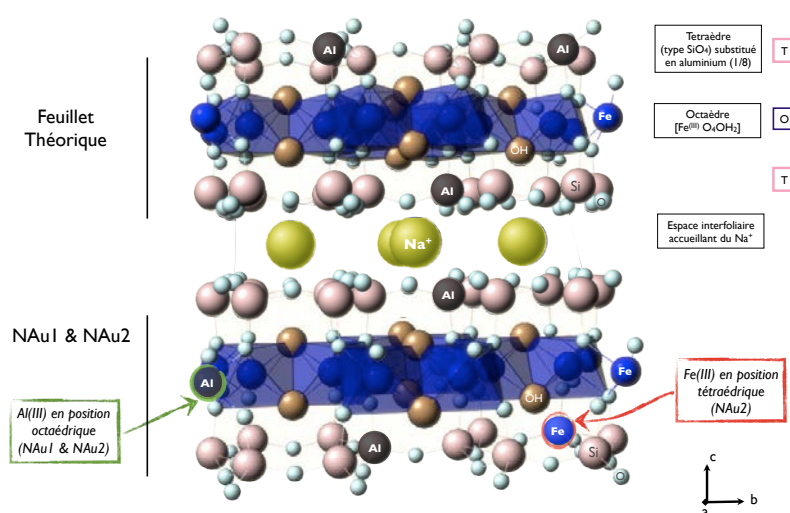


Figure 4 : Structure cristallographique des feuillets des nontronites $[(\text{Si}_7\text{Al})(\text{Fe})_4\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}]$. Leur structure est décrite comme une succession de couches, chacune constituée par l'association d'un feuillet ferrique à configuration octaédrique avec deux feuillets silicatés à configuration tétraédrique enrichi en aluminium. La couche octaédrique XO_4OH_2 est une succession d'octaèdres couchés sur une face triangulaire et composés de quatre oxygènes et deux hydroxyles (OH). La cavité octaédrique est occupée par du fer(III). La cohésion entre les feuillets est assurée par la présence d'une inter-couche de cations échangeables comme Na^+ .

Les substitutions hétérovalentes dans les sites tétraédriques ou octaédriques a (Al^{3+} vs Si^{4+} ; Mg^{2+} vs Fe^{3+} ...) affectent l'électro-neutralité de l'édifice cristallin des phyllosilicates. Dans le cas des nontronites, une substitution du silicium par un atome d'aluminium (Al^{3+}) au niveau de la couche tétraédrique crée un déficit de charges permanent. Dans les nontronites, ce déficit, porté à la fois par les sites tétraédriques ou octaédriques, est compris entre 0,4 à 1,2 charges par maille (Tableau 9).

La présence de cations compensateurs, monovalents (Na^+ , K^+) ou divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}), entre les feuillets permet d'équilibrer le déficit général de charges de la structure TOT (Stumm, 1992). Comme l'indique leur formule structurale, les deux nontronites sont dits « homo-ioniques » et ont été échangés au sodium.

Tableau 9 : Classification des phyllosilicates en fonction du type de feuillet, du déficit de charges du feuillet (X) par demi-maille et de sa localisation (Tétraédrique ou Octaédrique) ainsi que du taux d'occupation des sites octaédriques (d'après Perronnet, 2004).

Feuillet	Groupe	Charge		Couche octaédrique	Minéraux types	
		par unité formulaire	Localisation			
TO	Kaolins	~ 0	-	Dioc.	Dickite, Kaolinite, Nacrite	
	Serpentines			Trioc.	Antigorite, Lizardite, Amesite, Chrysotile	
TOT	Talc-pyrophyllite	~ 0	-	Dioc.	Pyrophyllite,	
				Trioc.	Talc, Willemseite	
	Smectites	0,2 à 0,6		T	Dioc.	Beidellite, Nontronite
				O		Montmorillonite
				T	Trioc.	Saponite
				O		Hectorite, Stévensite
	Hydro-micas (vermiculites)	0,6 à 0,9	T	Dioc.	Illite	
				Trioc.	Vermiculite	
	Micas	0,5 à 1,0		T/O	Dioc.	Muscovite, Celadonite
				T	Trioc.	Biotite, Phlogopite
Micas durs	~ 2	T	Dioc.	Margarite		
			Trioc.	Anandite		
TOT O'	Chlorite	variable	T	Tri-Dioc.	Dombassite Sudoite Clinocllore, chamosite	

La nontronite N Au-1 possède une charge totale par maille de 1,05. Ce déficit est réparti de la manière suivante : 1,02 pour le feuillet tétraédrique et 0,03 pour le feuillet octaédrique. La nontronite N Au-2 possède un déficit de charge totale plus faible 0,72 avec une distribution plus équilibrée et anormale entre le feuillet tétraédrique (0,45) et le feuillet octaédrique (0,27). Cette différence cristallochimique notable entre les deux nontronites est associée à l'incorporation d'une fraction du fer(III) dans les tétraèdres de N Au-2 : 20 mg de fer par gramme de nontronite contre 5 mg/g pour N Au-1, soit respectivement 8 et 2% du fer total.

Cette surabondance de fer dans le feuillet tétraédrique est à l'origine de la couleur brune de la nontronite N Au-2.

2.2. Les suspensions colloïdales de nontronite

Les lots de nontronite N Au-1 & N Au-2 utilisés se présentent sous la forme de suspensions colloïdales purifiées et calibrées, obtenus par fractionnement morphologique et purification d'échantillons macroscopiques des Nontronites d'Uley

Le protocole de purification et de fractionnement morphologique des feuillets inframicrométriques a été mis au point au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (UMR CNRS 7569, Université de Lorraine) par Michot *et al.* Il se compose de plusieurs étapes :

- L'échantillon macroscopique et consolidé de nontronite est réduit en poudre
- La poudre obtenue est dispersée dans une solution de NaCl (1M) pendant 24h. Les cations interfoliaires initiaux des nontronites sont ainsi échangés avec du sodium, afin d'obtenir des argiles homo-ioniques chargées en Na⁺.
- La suspension de nontronite homo-ionique-Na est centrifugée à 7700g pendant 20 minutes. Le culot est de nouveau dispersé dans une solution de NaCl (1M). Les particules de nontronite sont rincées trois fois puis dispersées dans de l'eau ultra-pure (Milli-Q).
- Les particules de nontronite sont séparées des minéraux solubles (*e.g* calcite) par une étape de dialyse (membrane de cellulose régénérée Visking, 76 mm, Roth) jusqu'à atteindre une conductivité inférieure à 5 µS.
- Les impuretés minéralogiques (*e.g* le quartz, les oxydes de fer, le feldspath, le kaolin) sont éliminées en plaçant la suspension dialysée dans un cône d'Imhoff pendant 24h.

- Une fois purifiée, la suspension obtenue est centrifugée pendant 90 minutes à 7000, 17000 et 35000g. Les culots obtenus à chaque étape sont dispersés dans de l'eau ultra-pure et constituent les suspensions colloïdales de taille T1, T2 et T3 respectivement. Le surnageant final fourni quant à lui la suspension de taille T4.

Dans les suspensions colloïdales obtenues, les nontronites sont présentes sous la forme de feuillets (TOT) de taille et de forme connues et parfaitement dispersés dans l'eau (Michot *et al.*, 2008). Leur solubilité est très faible ($[Fe] \ll 0,1 \mu M$) et la formation d'agrégats est inexistante. Les suspensions colloïdales de feuillets d'argile obtenues sont donc d'une grande pureté.

Les propriétés morphologiques des feuillets correspondant à chacune des tailles, dénommées T1, T2, T3 et T4 sont résumées dans le Tableau 10.

La pureté supérieure à 99.9% a été validée par diffraction aux rayons X (XRD, D8 Bruker, Co/Ka radiation) et spectroscopie infrarouge (Bruker, IFS 55).

Tableau 10 : Géométrie des particules de nontronites N_{Au-1} et N_{Au-2} dans les suspensions de taille 1, 2, 3 et 4. (d'après Michot *et al.* 2008). La concentration en particules de nontronite [NAu] des suspensions mères utilisées est indiquée.

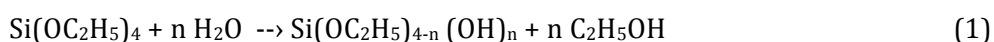
Minéral	Taille	Longueur l (nm)	Dispersion l (%)	Largeur L (nm)	Dispersion L (%)	Epaisseur H (nm)	CEC (meq/100g)	[NAu] g.L ⁻¹
N _{Au-1}	T1	580	52	60	50	1,05	109	
	T2	460	53	60	55	0,76	113	10,85
	T3	350	47	55	35	0,67	111	
	T4	190	44	38	38	0,55	125	
N _{Au-2}	T1	705	52	138	46	1,05	82	
	T2	368	41	93	39	1	89	11,4
	T3	147	39	52	37	0,67	84	
	T4	120	35	44	35	0,55	111	

3. Synthèse des gels de silice hybride

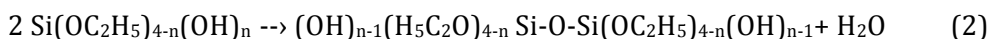
Les gels de silices purs (GS) et hybrides (GSH, contenant des particules minérales) utilisés au cours de cette étude ont été réalisés à partir du procédé sol-gel développé au LIEC par Grybos *et al.* en 2010 et validé par D. Oulkadi en 2013. Ce procédé sol-gel permet d'obtenir des structures rigides, poreuses et optiquement transparentes (bonne conduction optique) par des réactions chimiques simples à des pH et températures modérés (pH4 -6 et 20 -120°C). Les gels peuvent être dopés en particules minérales, comme les colloïdes de nontronite présentés ci-dessus. A l'échelle nanométrique, le gel est constitué de particules de nontronite piégées dans un réseau fractal de particules nanométriques de silice amorphe, ménageant des pores de 10 à 50 nm (Oulkadi *et al.* 2013a,b). En présence ou en absence de particules minérales, la structure de base de la matrice siliceuse est préservée et n'entrave pas la diffusion des molécules et métabolites microbiens.

Dans ce travail, la synthèse est effectuée à partir d'un précurseur de type alcoxysilane de formule Si-(OC₂H₅)₄: le tétraéthoxysilane (TEOS). Le contact entre le précurseur organique (alkyl) et l'eau produit des réactions chimiques simples à la base de nombreux procédés sol-gel (Brinker and Scherer, 1990)

L'hydrolyse des groupements alkoxy du TEOS en groupements silanols (Si-OH) intervient dans une première étape (éq. 1) et entraîne la libération d'un alcool, dans ce cas l'éthanol :



Les réactions de condensation débutent généralement avant la fin de l'hydrolyse complète des précurseurs. Les ponts siloxane (-Si-O-Si-) sont produits à partir de la condensation de deux groupements silanols avec libération d'une molécule d'eau selon l'équation (2):



Les ponts siloxanes sont les unités de base du polymère siliceux, précurseur du gel de silice. La polymérisation du TEOS conduit à la formation d'un « SOL » c'est à dire une solution colloïdale constituée de petits clusters de silice. L'augmentation de vitesse de condensation avec le nombre de liaisons siloxanes formées entraîne l'agrégation des clusters siliceux dans le volume disponible pour former la structure poreuse du gel de silice.

Les vitesses d'hydrolyse et de condensation du TEOS sont variables et déterminent la structure du SOL et donc la structure du matériau final. Elles ont un comportement opposé en fonction du pH : L'hydrolyse est accélérée en milieu acide et sa vitesse est minimale à pH 7 alors que la réaction de condensation présente une vitesse minimale à pH 2 (point isoélectrique de SiO₂) qui augmente à partir de pH 3, pour atteindre un maximum à pH 6. A pH basique, la réaction de condensation est réversible et la gélification ne survient plus.

Après gélification, l'extraction de l'éthanol piégé à l'intérieur du gel facilite la structuration et rigidification du gel.

Une synthèse reproductible des GSH requiert donc de maîtriser les processus :

- de distribution volumétrique des différents ingrédients
- de condensation/gélification par un pilotage pH très précis
- de maturation du gel, c'est à dire l'élimination par chauffage et évaporation du solvant piégé dans le gel durant la phase de condensation

Ces étapes sont d'autant plus critiques que le volume final désiré du gel est petit.

3.1. Les étapes de synthèse

Production du SOL par hydrolyse acide.- Dans un premier temps est préparée la solution SOL à partir du précurseur organique TEOS (tétraéthoxysilane, 99.9%, Aldrich, 86578), d'eau ultrapure (milli-Q) et d'acide chlorhydrique HCl (0.1 M) mélangés selon un ratio volumique 1 : 0,2 : 0,12 (vol/vol). Le mélange initial n'étant pas homogène, le SOL est soniqué à 55 kHz à température ambiante pendant 5 à 10 minutes jusqu'à obtention d'une solution limpide. Les ultrasons augmentent la surface de contact entre le TEOS et l'eau, forcent le processus de dissolution et par conséquent permettent de franchir la limite de non miscibilité alcoolate-eau.

Incorporation des particules minérales.- Le pH de la solution (SOL) est augmenté de pH 2,0 à pH 4,0 par addition de NaOH (0,1 M), homogénéisée, puis ajoutée aux suspensions de particules minérales. Après homogénéisation au Vortex, la suspension SOL-particules est rapidement distribuée dans les puits de microplaques en polypropylène. La forme du récipient sert de moule et définit la géométrie finale du gel.

Condensation et Gélification et maturation des gels.- Pour accélérer la condensation et la transition sol-gel, le pH est ensuite ajusté à pH 5,0 avec NaOH (0.1M). La solution en cours de gélification est conservée à température ambiante, durant tout le processus de condensation (12-24 heures).

Le Tableau 11 récapitule les volumes utilisés pour la préparation des gels de silice dopés ou non en particules minérales. Les proportions doivent être respectées quel que soit le volume final désiré (e.g. 200µL)

Maturation accélérée des gels.- Après gélification pour accélérer la maturation, les gels hybrides obtenus sont autoclavés deux fois à 110°C pendant 30 minutes dans de l'eau Milli-Q. Ce traitement a pour objectif de : (i) stabiliser la structure des gels, (ii) éliminer l'éthanol produit par hydrolyse des précurseurs TEOS, (iii) stériliser les gels avant leur utilisation.

La caractérisation par SAXS (Small-Angle X-ray Scattering), réalisée par Oulkadi et al. (2013) a mis en évidence que le traitement par autoclavage permet de stabiliser plus rapidement la structure du gel. Ce « vieillissement accéléré » des GSH dû au passage à l'autoclave catalyse la phase transitoire de structuration-condensation pour aboutir à un matériau dont la structure « quasi-stationnaire » évolue graduellement, mais de façon linéaire et limitée.

La structure des GSH étant très sensible aux conditions d'humidité relative de l'environnement, les gels matures sont stockés dans de l'eau ultra-pure stérile et conservés à température ambiante dans des tubes en polypropylène hermétiques ou confinés dans des sacs scellés. Exposés à l'air libre, la déshydratation des gels de silice est rapide, mais le phénomène est quasi-réversible tant que l'eau capillaire est présente ($a_w \gg 0,3$).

Durant la phase de maturation, la réduction de volume est isotrope. Le facteur de réduction est d'environ 2/3, i.e. pour un volume final avant condensation de 200 μ L de SOL, on obtient un gel de silice mature d'environ 70 μ L (

Tableau 12). Avec des suspensions colloïdales de l'ordre de 11 g.L⁻¹ de nontronite, on dénombre environ 10¹⁶ particules par litre de gel.

Tableau 11 : Récapitulatif des volumes respectifs (en ml) de chaque solution utilisées pour la préparation des Gels de silice hybrides (volume final de SOL avant condensation 12,5 ml) .

TEOS (ml)	HCl 0,1M (ml)	Eau milli-Q (ml)	NaOH 0,1M (ml)	Susp.nontronite + H2O qsp (ml)	NaOH 0,1 M (ml)	Vol. final avant condensation (ml)
5	0,6	1	0,3	5,25	0,35	12,5
Hydrolysats ou SOL (6,9 ml soit 55%)				Ajout éléments dopants * (42%)	Accél. gélif. (3%)	

* y compris Agar Noble, si nécessaire.

Tableau 12 : Caractéristiques géométriques moyennes (n =29) des gels de silice de silice purs (GS) déterminées par analyse d'images. Les gels sont synthétisés en microplaque à partir de 200 μ L de SOL (avant condensation). La hauteur correspond à la moyenne des hauteurs mesurées au bord et au centre du gel (au fond du menisque). Le volume calculé correspond à celui du cylindre de référence.

	Moyenne	St.Dev	Min.	Max.	CV (%)
Diamètre (mm)	4,994	0,026	4,934	5,035	0,52
Hauteur (mm)	3,436	0,210	3,263	3,679	6,13
Volume (μ l)	67,3		58,3	74,9	

3.2. Synthèse des GSH robotisée

Ce travail de thèse a exigé la fabrication d'une grande quantité de gels de petites tailles (<100 μ l). En particulier, la robustesse des expériences en microplaques (criblage de la banque, bioassays avec des biosenseurs) imposait d'obtenir une bonne reproductibilité des synthèses de gel en microplaques (volume porosité...). Le protocole de synthèse des gels de silice a donc été automatisé, pour être exécuté dans des microplaques 96 puits autoclavables avec l'aide d'un robot de pipetage automatique (epMotion 5070, Eppendorf Germany). Les microplaques utilisées sont en polypropylène autoclavable et à fond plat (Microplate 96/F en polypropylène Eppendorf; PCR clean ; ref 0030 601.106). Elles servent à la fois de moule lors de la synthèse et de support de culture et de lecture spectrophotométrique lors des expériences biotiques en présence de biosenseurs bactériens. Ce système automatique garantit une parfaite reproductibilité de la synthèse des gels de petits volumes ; la volumétrie et les temps d'exécution des différentes étapes du protocole sont parfaitement maîtrisés depuis l'hydrolyse jusqu'à l'autoclavage.

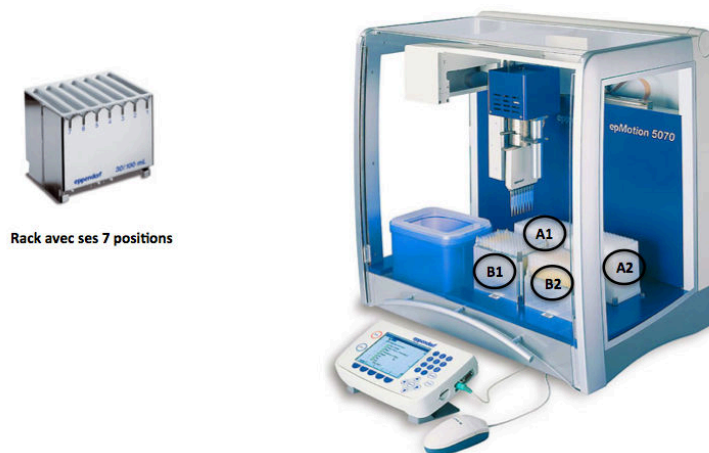


Figure 10 : Système de Pipetage Automatique Eppendorf epMotion 5070. Deux microplaques 96 puits sont préparées simultanément (emplacement A2 et B2).

Le robot travaille sur deux microplaques à la fois : 192 gels sont ainsi synthétisés simultanément.

Les réservoirs en polypropylène autoclavable de 30 ou 100 ml du rack contiennent les suspensions de nontronite, la solution SOL préparée extemporanément, l'eau ultrapure, la solution de soude (NaOH, 0.1N)

Le système de pipetage automatique distribue dans l'ordre suivant dans chaque puits :

- 84,7 μ l de l'hydrolysate acide des précurseurs préparée (SOL) (
- 19,2 μ l d'agar Noble
- 3,8 μ l de NaOH (0.1 M)
- 48 μ l de nontronites (NAu-1 10,9 g/l, NAu-2 11,4 g/l) ou 48 μ l de d'H₂O milliQ et
- 4,5 μ l de NaOH (0.1 M)

L'ajout d'une petite fraction d'agar permet d'améliorer les propriétés de texture des gels (*e.g* résistance à la fracture). Le premier ajout de soude remonte le pH à 4 pour initier le processus de condensation et éviter la dissolution des nontronites au moment de leur incorporation. Le second ajuste le pH à 5 afin d'accélérer le processus de condensation des gels.

Le mélange final est homogénéisé à l'aide de l'agitateur à microplaques Eppendorf MixMate (1200 rpm pendant 30 secondes) puis chaque microplaque est enveloppée d'un film de paraffine (Parafilm) et laissée en gélification à température ambiante durant une nuit.

Après une nuit de maturation à température ambiante, chaque puits reçoit 200 μ l d'eau milliQ afin d'éviter que les gels ne se dessèchent et se fissurent. Pour évacuer l'éthanol formé pendant la phase de condensation, les microplaques sont placées à 70°C dans une centrifugeuse sous vide (SpeedVac, Juan Concentrator system RC1010 ; Thermo Scientific) durant deux heures. L'éthanol évaporé est récupéré par condensation sur un piège froid. Un ajout d'eau milliQ, 100 μ l est réalisé chaque heure.

Pour finir, les microplaques sont placées dans un double sac et autoclavées à 120°C pendant 20 minutes (Figure 11). En plus de stériliser, l'autoclavage a pour effet de stabiliser la structure des gels et d'éliminer les dernières traces d'éthanol (Oulkadi, 2013). La microplaque emballée est ensuite stockée à 4°C.



Figure 11: Gels de silice hybride matures conditionnés en atmosphère humide et stérile après autoclavage et synthèse automatisée (Robot Eppendorf epMotion 5070)

4. Milieux de culture

Trois milieux de culture furent utilisés au cours de ce travail pour les expériences avec les biosenseurs à cellule entière et le criblage de la banque de promoteurs.

Un ensemble de solution stocks ont été préparées et stockées à température ambiante à l'abri de la lumière.

Tableau 13 : Solutions « Stocks » pour la préparation des différents milieux et des plans d'expériences à stocker à température ambiante

Composés	Masse (g)	Volume (H ₂ O, ml)	Concentration (M)	Commentaires
NH ₄ Cl	50.82	500	1.9	
K ₂ SO ₄	4.8	100	0.276	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294	100	0.02	
MgCl ₂	50.75	100	2.5	
NaCl	292.2	1000	5	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.028	10	0.01	A utiliser dans la journée
KOH	56.1	100	10	
NaOH	4	10	10	
Glucose 100X	10	100	0.555	A utiliser dans la journée
K ₂ HPO ₄	23.0	1000	0.132	A autoclaver
H ₂ O milliQ stérile		Qsp		A autoclaver (120°C, 20 min.)

4.1. Le milieu LB (lysogeny broth)

Le milieu LB a été réalisé en dissolvant 20g de LB Broth (Lennox, Sigma L3022) dans 1L d'H₂O milliQ. Le pH de la solution est compris entre 6,8 et 7,2. La solution est ensuite stérilisée par autoclave (110°C, 30 min) et stockée à température ambiante avant utilisation.

Au besoin, le milieu est additionné d'antibiotique aux concentrations suivantes :

- ampicilline 100 µg.mL⁻¹
- kanamycine 30 µg.mL⁻¹ (pour *E. coli*) – 500 µg.mL⁻¹ (pour *P. aeruginosa*)
- gentamycine 10 µg.mL⁻¹ (pour *E. coli*) – 30 µg.mL⁻¹ (pour *P. aeruginosa*)
- tetracycline 10 µg.mL⁻¹ (pour *E. coli*) – 50 µg.mL⁻¹ (pour *P. aeruginosa*)

Ce milieu complet sert à cultiver l'ensemble des souches d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* utilisées dans cette étude. En raison de sa forte fluorescence, il n'a pas été employé dans les expériences

avec biosenseurs, même si les méthodes de traitement de signal (Cf Chapitre 1) éliminent sans difficulté ce signal autofluorescent parasite.

Les bactéries conservées à -80°C dans du glycérol sont mises en culture sur boîte de LB gélosé à 37°C additionné ou non d'antibiotiques. Le repiquage d'une colonie est réalisé en milieu LB liquide (5 mL) durant une nuit dans un agitateur thermo-régulé (37°C, 250 rpm). Les culots de biosenseurs sont récoltés par centrifugation (4500g, 10 min) avant d'être resuspendus deux fois dans le milieu choisi pour les expériences (DCAA ou MOPS).

4.2. Le milieu DCAA (Deferrated CasAmino Acid)

Ce milieu « déferritisé », utilisé pour les études utilisant des biosenseurs « fer », a été réalisé sur la base des travaux de Visca *et al.* (1993). C'est un milieu minimum carencé en fer, qui contient à la base 5g de casamino acids (Difco) dilués dans un litre d'eau milliQ. Pour l'étape de déférritisation, la solution est mise au contact avec une résine échangeuse d'anions (Chelex 100 ; 5 g.L⁻¹) pendant 20h à 4°C. La résine est ensuite séparée du milieu par filtration et le pH ajusté à 7,4 par addition de quelques gouttes de NaOH (1N). La solution carencée en fer est ensuite stérilisée par autoclave (110°C, 30 min) avant d'être supplémentée en sels minéraux MgCl₂ (0.4 mM) et de K₂HPO₄ (5 mM). Les solutions stocks correspondantes sont préalablement stérilisées par filtration.

4.3. Le milieu minimal MOPS

Le protocole de préparation du milieu tamponné MOPS a été réalisé à partir des travaux de Neidhardt *et al.* (1974). Le nom du milieu provient de l'emploi dans son élaboration de MOPS (3-[N-morpholino]propane sulfonic acide ; C₇H₁₅NOS), un tampon zwitterionique dont le pH est ajustable entre 6,5 et 7,9.

Dans un premier temps, en complément des solutions stocks (Tableau 13), une solution de micro-nutriments doit être préparée (Tableau 14).

Tableau 14 : Solutions d'éléments essentiels (micro-nutriments) à préparer pour la fabrication du milieu MOPS - A stocker à température ambiante

Éléments essentiels	Masse (g)	Volume (ml)	Commentaires
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O (ammonium molybdate)	0.009		
H ₃ BO ₃	0.062		
CoCl ₂	0.018		
CuSO ₄	0.006		
MnCl ₂	0.040		
ZnSO ₄	0.007		
H ₂ O milliQ stérile		Qsp pour 50 ml	A autoclaver (110°C 30 min)

La préparation de la solution mère 10 fois concentrée du milieu (MOPS 10X) est réalisée ainsi :

- 1- Dans 300 ml d'H₂O milliQ stérile, ajouter, sous agitation magnétique : 83,72g de tampon MOPS (C₇H₁₅NOS) et 7,17g de tricine
- 2- Ajuster le pH à 7,4 avec une solution de KOH à 10M (10 à 20 ml)
- 3- Ajuster le volume à 440 ml avec de l'eau milliQ, puis ajouter 10 ml de FeSO₄•7H₂O à 0,01M
- 4- Ajouter les différentes solutions stocks dans l'ordre suivant :
 - a. 50 ml de NH₄Cl
 - b. 10 ml de K₂SO₄
 - c. 0,25 ml de CaCl₂•2H₂O
 - d. 2,1 ml de MgCl₂
 - e. 100 ml de NaCl
 - f. 0,2 ml de la solution de Micronutriments

- 5- Ajouter en quantité suffisante de l'eau milliQ autoclavée pour 1 litre (environ 380 ml)
- 6- Stériliser la solution obtenue par filtration à 0,22 micron.
- 7- Répartir la solution filtrée Mops 10x dans des tubes Falcon™ de 50 ml stériles et les congeler à -20°C pour conservation.

La préparation d'un litre de milieu de culture MOPS en mélangeant dans 1 litre d'eau milliQ, 100 ml de solution MOPS 10X et 10 ml de solution stock de K_2HPO_4 .

Le pH est ajusté à 7,2 avec une solution de NaOH 1M avant une étape de stérilisation par filtration à 0,2 micron.

Le milieu MOPS obtenu peut être conservé plus d'un mois à 4°C avant utilisation.

Avant chaque culture, on ajoute une quantité suffisante de glucose 100 g.l^{-1} , pour obtenir une concentration finale de 0,1%.

5. Les dispositifs d'incubation

Afin d'incuber les microplaques 96 puits à 37°C en évitant les problèmes d'évaporation, un dispositif très simple a été mis au point. Le fond d'une jarre MART™ (destinée aux cultures anaérobies) a été recouvert de cotons humidifiés et la jarre elle-même fermée à l'aide d'une feuille de papier sulfurisé (Figure 12). Les microplaques (munies de leur couvercle) sont disposées sur des portoirs de microtubes Eppendorf. Quatre microplaques peuvent être ainsi placées dans une jarre.



Figure 12 : Dispositif d'incubation en jarre des microplaques 96 puits

A 37 °C, la jarre est ainsi saturée en vapeur d'eau, ce qui empêche les solutions contenues dans les puits de s'évaporer (pression de vapeur saturante). Sur 48h d'incubation, le taux d'évaporation estimé dans chaque puits n'excède pas 10%.

6. Dosage des éléments et substances en solution

Après incubation, les suspensions de biosenseurs sont séparés des gels et filtrées à $0,22\ \mu\text{m}$. Pour le dosage des acides organiques en chromatographie ionique, le filtrat est stocké à -20 °C.

6.1. Mesure de la concentration en fer en solution

Les mesures de concentration du fer libéré lors de l'altération de la nontronite ont été réalisées de deux manières différentes. La première, basée sur la quantification par spectrométrie par torche à plasma, nécessite des volumes importants de solution (>1 ml). La seconde consiste en l'utilisation d'un indicateur coloré, complexant puissant du fer(II) et compétitif des complexes organiques, le Ferrospectral® (Merck 1.14761), utilisable dans des volumes réduits d'analytes comme ceux disponibles dans les puits des microplaques (Balland et al., 2010; Grybos et al., 2010, Oulkadi 2013).

La quantité de fer (II & III) solubilisé est déterminé par photométrie à 565 nm (FLX-Xenius SAFAS) en présence de Ferrospectral® (Merck 1.14761) : 20 µl de Ferrospectral® sont additionnés à 200 µl de la solution faiblement chargée et préalablement filtrée à 0.22 µm.

Le coefficient d'extinction molaire est de 27570 M⁻¹ cm⁻¹ à 565 nm, la quantité de fer solubilisé (mg.L⁻¹) est donné par la relation suivante:

$$[\text{Fe}]_{\text{ppm}} = 2 \times \text{O.D.}_{565 \text{ nm}} (\pm 0.25\%)$$

pour une cuve de trajet optique 10mm.

Dans nos conditions expérimentales, la limite de détection est de 350 nM de fer et la saturation de 50-100 µM.

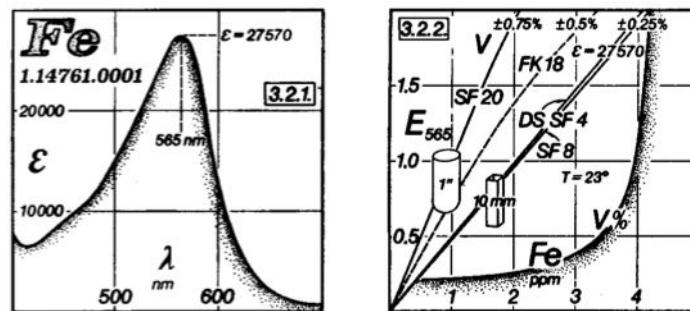


Figure 13 : Spectre d'absorbance du Ferrospectral® (mélange de [3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine, Na] + thioglycolate ammonium) et gamme étalon établie dans l'eau à 565 nm (Source Merck)

En plus du bathochrome [3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine, Na₂], la solution de Ferrospectral®, contient un agent réducteur du fer(III) : le thioglycolate ammonium. Il favorise la solubilisation des colloïdes de fer(III) et affaiblit la force de complexation des ligands organiques (e.g. ascorbate, acétate, oxalate, tartrate, citrate, sidérophores...).

6.2. Mesure de la concentration en fer adsorbé ou précipité

Le fer(III) adsorbé sur la silice amorphe ou précipité sous forme d'oxy-hydroxydes mal cristallisés dans la porosité des gels est également analysé. Ces fractions peu solubles sont dosées après ajout de KCl (1M à pH7) et une solution d'hydroxylamine KCl (NH₂OH 0,2% ; KCl 1M ; pH 7) par volume de GSH. Après 1 heure d'incubation à 28°C, le fer dissous est quantifié, comme précédemment, par ajout de 20 µl de Ferrospectral® à 200 µl de la solution filtrée d'hydroxylamine KCl. Le fer total libéré correspond à la somme du fer dissous et du fer précipité remis en solution après traitement à l'hydroxylamine et au chlorure de potassium.

Ce protocole a été adapté et utilisé pour quantifier le fer dissous dans les expérimentations en microplaques 96 puits avec gels de silice.

Avant le dosage, les microplaques sont centrifugées et chaque surnageant est transféré puits à puits dans une microplaque 96 puits équipés de filtres (Millipore Multi-screen 0.22µm). Une filtration puits à puits permet de récupérer les solutions dans une microplaque 96 puits transparente stérile. La quantité de fer dissous (*i.e* extrait des nontronites) est déterminé par photométrie après ajout de l'indicateur coloré Ferrospectral® décrit précédemment dans chaque puits.

En parallèle, les gels de silice dopés en nontronite N_{Au}-1/N_{Au}-2 sont transférés successivement dans 100 µl d'une solution de chlorure de d'hydroxylamine KCl afin d'extraire successivement le fer(III) adsorbé et le fer précipité au sein de la matrice siliceuse. Après incubation d'une heure à 28°C, les gels sont jetés et la solution est analysée au Ferrospectral®

En raison de la formation de ménisques important dans les puits en polypropylène, le dosage en microplaque requiert une gamme étalon établi avec du sel de Mohr (NH₄FeSO₄, 6H₂O, 7 g.L⁻¹, solution mère pour dilution en cascade)

6.3. Détermination des métabolites produits

Les acides organiques ont été quantifiés par chromatographie ionique (ICS 3000, Dionex corp.) équipée d'une colonne Ion Pac® (AS 11 HC, Dionex corp.) suivant un gradient de d'hydroxyde de potassium (0.9-60 mM) sur 50 minutes (débit : 1,3 ml/min). Les solutions standards (0,1 M) qui ont été utilisées pour l'analyse sont : l'acétate de sodium, le citrate de sodium, le formate de sodium, le gluconate sodium, le D, L-malate de sodium, l'oxalate de sodium, le propionate de sodium, le succinate de sodium (Sigma Aldrich), le lactate de sodium et le malonate de sodium (Fluka). La limite de détection de la méthode est d'approximativement 0,1 ppm.

7. Mesures spectrométriques de fluorescence

Toutes les mesures d'absorbance et de fluorescence en microplaques ou en cuves, sur des gels de silice, des suspensions de biosenseurs, ont été réalisées avec un spectrofluorimètre FLX-Xenius thermo-régulé (SAFAS, Monaco, Figure 14). Ce spectromètre, qui fait aussi office de lecteur de microplaques, est équipé d'un porte-échantillon motorisé assurant l'analyse de suspensions de biosenseurs bactériens ou de gels de silice hybride disposés dans les puits de microplaques :

- à fond plat transparent pour les mesures d'absorbance (Eppendorf Multiplate96/F, PCR clean, stérile, Clear)
- à fond rond noire pour les mesures de fluorescence (Eppendorf Multiplate96/U, PCR clean, stérile, Black)

Les microplaques 96 puits utilisées sont en polypropylène (PP) autoclavable et réutilisable. Le volume de travail par puits est compris entre 20-350µL. Elles possèdent une très faible fluorescence basale et une bonne transparence optique.

Le spectromètre FLX Xenius est doté d'une détection multi-mode, associant des photomultiplicateurs pour les mesures d'absorbance et de fluorescence et un compteur de photons haute-sensibilité pour les mesures de luminescence. Le banc optique est organisé autour de deux monochromateurs « synchronisables » qui assurent rapidement des mesures rapides (balayage jusqu'à 7000 nm/min) à longueur d'onde fixe ou l'acquisition de spectres d'absorbance ou de fluorescence dans les puits des microplaques ou des cuves. La gamme de longueur d'onde couverte est comprise entre 190nm et 1000 nm avec une reproductibilité <0,1 nm et une linéarité sur 5 ordres de grandeurs. L'ouverture des fentes d'entrée des deux monochromateurs est continuellement ajustable entre 1 et 30 nm avec un pas de 0,1 nm.

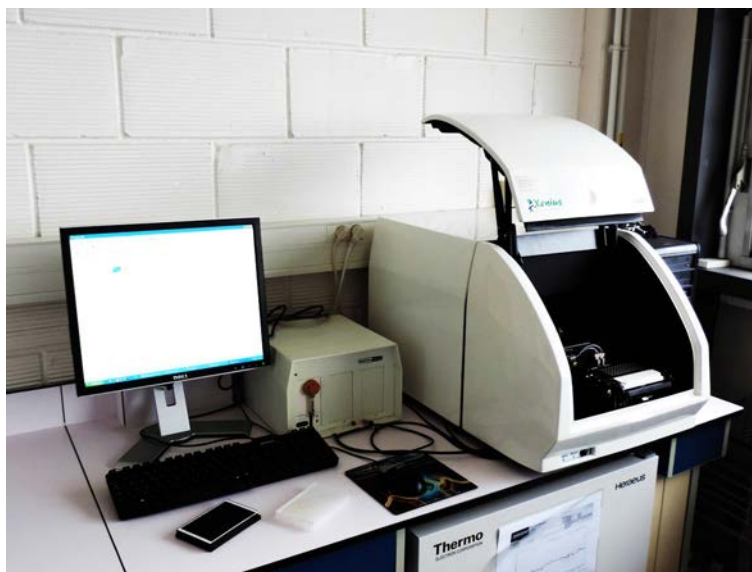


Figure 14 : Spectromètre Xenius FLX (SAFAS, Monaco) équipé d'un porte cuve (10 cuves) et d'une platine porte-échantillon, motorisés et thermo-régulés par circulation de fluide caloporteur (-5° à 80°C). Son dispositif à double-monochromateur permet des mesures d'absorbance, de fluorescence (excitation, émission et synchrone) et de luminescence (comptage de photons) sur des échantillons solides ou liquides (e.g. gel de silice GSH, suspension de biosenseurs à cellules entières)

7.1. La spectrométrie de fluorescence

Après incubation des microplaques ou des suspensions de biosenseurs, l'émission de fluorescence est mesurée dans chacun des puits à l'aide du spectrofluorimètre FLX-Xenius (SAFAS, Monaco), présenté précédemment. Pour la réalisation des spectres de fluorescence, le système offre 3 modes d'acquisition : excitation, émission et synchrone.

Dans le premier cas, la longueur d'onde et la bande passante (BW) d'émission sont fixées (e.g. 550 nm \pm 5 nm) et le balayage est réalisé à pas constant (e.g. 1 nm) par le monochromateur d'excitation pour des longueurs d'onde inférieure à la bande d'émission sélectionnée ($\lambda \ll \lambda_{em} - \frac{1}{2} BW$). Inversement, dans le second cas, la longueur d'onde et la bande passante d'excitation sont fixées et le balayage est réalisé par le monochromateur d'émission pour des longueurs d'onde supérieure à la bande d'excitation sélectionnée ($\lambda \gg + \frac{1}{2} BW$).

Pour la mesure synchrone, les deux monochromateurs sont synchronisés avec un décalage en longueur d'onde fixe. Les balayages en émission (λ_{em}) et en excitation (λ_{ex}) sont effectués simultanément et de manière synchrone avec un écart constant $\Delta\lambda$ (lambda shift). Ci-après, un exemple typique de réglage pour des mesures de suspensions auto-fluorescentes contenant des biosenseurs bactériens :

- Balayage λ_{ex} = [350 - 700] nm
- Décalage spectral : $\Delta\lambda$ = 20 nm
- Pas = 2 nm
- Bande passante (BW) : Excitatrice = 10 nm ; Emission = 10 nm
- Temps d'acquisition = 0,2 sec
- Voltage du Photomultiplicateur = 700 V

Un exemple d'une série de spectres synchrones obtenus sur des suspensions de biosenseurs fluorescents est montré Figure 15B.

Remarque : Pour tous les spectres synchrones présentés dans ce travail, c'est la longueur d'onde d'excitation qui est reportée en abscisse.

7.2. La spectrométrie optique sur gel de silice hybride

Dans ce travail, les gels ont été étudiés par spectroscopie UV-Visible entre 300 et 900nm, afin de caractériser les transformations cristalochimiques des particules de nontronite, immobilisées ou non dans des GSH, et après incubation en présence de bactéries. L'excellente conduction optique des gels permet de travailler directement.

L'utilisation de réflexion diffuse UV-Vis sur poudre est largement répandue en minéralogie et dans l'industrie des matériaux, afin de caractériser le statut de métaux de transition comme le fer dans des échantillons minéraux (e.g. oxydes de fer) ou pour évaluer les propriétés optiques de certaines matières minérales (Delineau, 1994 ; De Donato, 1993).

Dans le cas présent, la relative transparence et la bonne conduction optique des GSH permettent d'acquérir des spectres électroniques en transmission des particules de nontronites dispersées dans la matrice siliceuse (Esnault, 2010). L'absorbance est mesurée *in vitro* et *in vivo* sans être obligé de sécher ou de réduire en poudre le gel de silice. Avec la connaissance du volume du gel, de la concentration en particules et du trajet optique, la loi de Beer-Lambert s'applique simplement.

Les modifications des transitions électroniques des GSH après traitement biologique ou chimique sont analysées en transmission par spectrométrie d'absorption UV-Vis dans le but de caractériser l'évolution du statut du fer dans la structure des nontronites N_{Au}-2. Les spectres UV-Visible ont été enregistrés grâce au spectrofluorimètre Xenius FLX (SAFAS) entre 300 et 800 nm.

Dans cette gamme spectrale, les spectres obtenus résultent principalement de processus d'absorption sélective des photons incidents en fonction des caractéristiques minéralogiques et chimiques des particules. Les bandes d'absorption obtenues sont liées à des absorptions sélectives des photons, en fonction des caractéristiques chimiques des particules de nontronite. Les transitions électroniques du fer(III) génèrent des bandes d'absorption intenses entre 340 et 600 nm. Elles résultent principalement des transitions électroniques :

- des orbitales 3d des ions : Fe²⁺ (4s⁰, 3d⁶) Fe³⁺ (4s⁰, 3d⁵)
- entre ligands et métal (O-Fe) ou entre métal-métal au sein des sites octaédriques et tétraédriques.

Les spectres d'absorption obtenus sont aussi perturbés par des phénomènes complexes de réflexion et diffraction du rayonnement au sein du gel, dus aux propriétés texturales du réseau de silice (tortuosité, porosité et arrangement des agrégats) et au changement d'indice de réfraction aux interfaces silice-eau. On constate ainsi une augmentation progressive de la ligne de base en-deçà de 400 nm, bien visible sur des gels enrichis avec une smectite non ferrière de type montmorillonite (Oulkadi 2013).

8. Les plans d'expériences pour la production de données tri-linéaires

Le plan d'expérience permettant la production de données trilineaires relatives est décrit par la Figure 15A et a été réalisé au sein d'une microplaque Eppendorf PP 96 puits noir stérile. A l'aide du système de pipetage automatique Eppendorf epMotion 5070, 200 µl de milieu DCAA sont distribués dans chacun des 84 puits, puis à partir d'une solution de FeCl₃ à 6 mM (préparée dans du milieu DCAA dépourvu de MgCl₂ et K₂HPO₄), une dilution en cascade d'un facteur trois est effectuée entre les colonnes 1 et 12 afin d'obtenir la gamme de concentration en fer désirée.

En parallèle, les souches LIEC01 et LIEC08 ont été pré-cultivées dans 3 ml de milieu LB contenant 500 mg/l kanamycine pendant 12h à 37°C (agitation 250 rpm ; Thermo Scientific MaxQ 4000) puis rincée deux fois dans du milieu DCAA. La DO₆₀₀ a ensuite été ajustée à 1.

À l'aide du système de pipetage automatique, chacune des souches a été distribuée selon le ratio (xx :yy) décrit dans la Figure 15 pour une DO₆₀₀ finale de 0,1.

La microplaque a ensuite été incubée à 37°C sous une faible agitation (130 rpm) pendant 24h à l'aide du dispositif décrit précédemment (figure 3).

Afin d'étudier l'impact de la présence de pyoverdine sur le comportement du système génétique *bfrB/pvdA*, la même expérience a été réalisée avec les souches *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta pvdA$ *bfrB*-E₂Orange (LIEC03) et *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta pvdA$ *pvdA*-dsRed express2 (LIEC10).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2 mM 95 : 5	667 μ M 95 : 5	222 μ M 95 : 5	74 μ M 95 : 5	25 μ M 95 : 5	8 μ M 95 : 5	3 μ M 95 : 5	914 nM 95 : 5	305 nM 95 : 5	101 nM 95 : 5	34 nM 95 : 5	11 nM 95 : 5
B	2 mM 80 : 20	667 μ M 80 : 20	→	→	→	→	→	→	→	→	→	11 nM 80 : 20
C	2 mM 60 : 40	↓	222 μ M 60 : 40									↗
D	2 mM 50 : 50	↓		↘						101 nM 50 : 50		
E	2 mM 40 : 60	↓			25 μ M 40 : 60							
F	2 mM 20 : 80	↓						914 nM 20 : 80				
G	2 mM 5 : 95	667 μ M 5 : 95					3 μ M 5 : 95					11 nM 5 : 95
H	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank

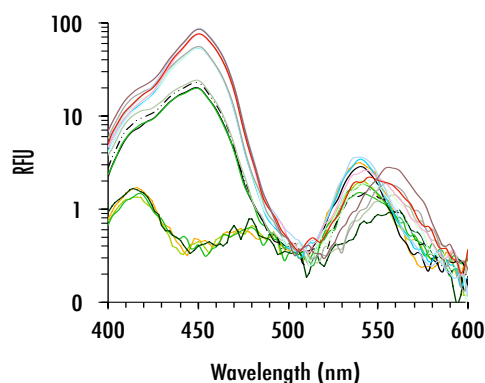


Figure 15: Plan d'expérience permettant la production de données trilineaires relatives à l'étude de l'activité des promoteurs *bfrB* et *pvdA* en fonction de la $[FeCl]$. De la colonne 1 à la colonne 12, la concentration en Fer(III) du milieu varie successivement d'un facteur 3 passant de 2 mM à 11 nM. De la ligne A à la ligne G, le ratio des deux souches varie de manière constante passant de 95% LIEC01 / 5% LIEC08 à 5% LIEC01 / 95% LIEC08.

Après incubation, chaque puits est homogénéisé à l'aide d'une pipette multicanaux Eppendorf 100 μ l, puis un spectre de fluorescence synchrone est réalisé sur chacun des 84 puits avec le spectrofluorimètre FLX-Xenius SAFAS avec les paramètres suivants :

- Balayage λ_{ex} = [400 – 600] nm
- Décalage spectral : $\Delta\lambda$ = 20 nm
- Pas = 2 nm
- Bande passante (BW) : Excitatrice = 10 nm ; Emission = 10 nm
- Temps d'acquisition = 0,1 sec
- Voltage du Photomultiplicateur = 700 V

9. Recherche de gènes sensibles aux textures minérales

L'objectif *in fine* de cette série d'expérience est de mettre en évidence l'existence de gènes chez des bactéries Gram- dont les expressions conjointes traduiraient le niveau et la qualité de l'interaction entre les cellules et leur environnement minéral immédiat. Cet environnement minéral est constitué de particules libres en suspensions ou de gels de silice dopés ou non en particules de nontronite.

Pour cela, nous disposons :

- D'une collection de clones d'*Escherichia coli* K12 à partir desquels il est possible d'évaluer l'activité d'environ 75% des promoteurs de la souche sauvage *E.coli* K-12 MG1655.
- De suspensions colloïdales de microparticules minérales modèles (nontronite, taille 2) présentées en amont.
- De gels de silice purs ou dopés en particules de nontronite.

9.1. Collection de promoteurs d'*Escherichia coli* K12 (Zaslaver et al. 2006)

La collection, distribuée par la société Open Biosystems (USA), se présente sous la forme d'une série de microplaques (21 microplaques de 96 puits) contenant 1810 clones d'*Escherichia coli* K12 MG1655. Chaque clone a été transformé par un plasmide à faible nombre de copies contenant un promoteur fusionné au gène rapporteur *gfpmut2*. Cette construction permet de rendre compte de l'activité des promoteurs par mesure de la fluorescence de la GFP. Cette mesure est réalisée par spectrométrie avec une excitation optimale à 481 nm et un maximum d'émission à 507 nm. Pour faciliter les opérations de calibration, 3 promoteurs de contrôle (*serA*, *wrbA*, *lacZ*), 2 clones sans promoteur (U139 et U66) et un blanc (Empty) sont disposés systématiquement dans chaque microplaque (Figure 16).

Figure 16 : Exemple d'une partition de promoteurs sur une des microplaque de la collection de clones fluorescents d'*Escherichia coli* K12 (Zaslaver, et al. 2006). Les 3 promoteurs de contrôle (*serA*, *wrbA*, *lacZ*) sont figurés en vert et les clones sans promoteur en rose

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	focA	mdtG	narU	ydjE	yfcJ	idnT	yjhF	dkgA	yaaU	ygbN	b1403	Empty
B	yqhH	gmr	ymjA	uspE	ydaO	ydaG	uspF	yncJ	yddE	yddM	cspD	ycaC
C	ycaN	ycaO	serA	ycdM	b1027	yceF	ycfQ	b1142	ydhP	U139	b1172	ycgR
D	fsr	ynfL	ydhB	ribE	kdgR	yabN	yebA	ptsA	gntP	ydcJ	rssA	ompW
E	ycjZ	fes	cmr	tonB	yhhT	pheP	chaC	nupG	yniA	ydjX	yddW	yneE
F	yneH	nohA	U66	glnH	hcaT	nanT	uhpT	uhpA	ydcI	wrbA	yehJ	yciC
G	ycjY	fepA	narX	yciI	uxaC	ppiA	shiA	yncG	glpA	fadL	nupC	yqeG
H	lacZ	ygfU	pitA	xylF	corA	cysZ	codB	mscL	gntT	zntA	lctP	rbsD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FNT family transport protein (formate channel 1)	putative MFS family transport protein (1st module)	MFS superfamily, nitrate extrusion protein (1st module)	putative MFS family transport protein (1st module)	putative MFS family transport protein (2nd module)	IdnT idonate Gnt transporter	putative GntP family transport protein	2,5-diketo-D-gluconate reductase A	putative MFS family transport protein (1st module)	putative GntP family transport protein (1st module)	IS21 protein 2	Empty well
B	putative outer membrane lipoprotein	conserved protein (2nd module)	unknown CDS	conserved protein with adenine nucleotide-binding	conserved protein	Rac prophage;	conserved hypothetical protein with adenine nucleotide-binding	unknown CDS	conserved protein	putative transcriptional regulator (OmpR family)	similar to CspA but not cold shock induced, nucleic acid-	putative cysteine hydrolase
C	putative transcriptional regulator (LysR family) (1st module)	conserved hypothetical protein (3rd module)	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	putative enzyme	putative transposase-related protein	conserved protein	putative regulator (TetR/AcrR family)	e14 prophage	putative MFS family transport protein (1st module)	promoterless strain	conserved hypothetical protein	putative regulator (TetR/AcrR family)
D	MFS family fosmidomycin transport protein (2nd module)	putative transcriptional regulator (LysR family) (1st module)	putative transcriptional regulator (LysR family)	riboflavin synthase, alpha chain	putative transcriptional repressor (IclR family)	putative periplasmic binding protein of transport	conserved protein	General PTS family, enzyme I, phosphohistidine domain	GntP family, gluconate transport protein, GNT III system	conserved hypothetical protein	putative transmembrane protein	OmpW, outer membrane protein
E	putative transcriptional regulator (LysR family) (1st module)	enterochelin esterase	MFS superfamily transporter, multidrug/chloramphenicol	energy transducer; uptake of iron, cyanocobal	putative PerM family permease (1st module)	APC family, phenylalanine transporter (2nd module)	cation transport regulator	MFS family, nucleoside transport (2nd module)	conserved protein, kinase-like	putative YdjX-Z family transport protein	conserved protein with glycosyltransferase domain	putative transmembrane transporter
F	putative glutaminase	Qin prophage; packaging protein NU1	promoterless strain	ABC superfamily (peri_bind) glutamine high-affinity	putative 3-phenylpropionic acid MFS family transport protein (1st module)	MFS family, sialic acid transport protein (1st module)	MFS family, hexose phosphate transport protein,	response regulator (activator) in two-component	putative transcriptional regulator (LysR family) (1st module)	flavodoxin-like protein, trp repressor binding	conserved hypothetical protein	putative membrane protein (1st module)
G	conserved hypothetical protein with alpha/beta-Hydrolase	outer membrane porin, receptor for ferric	sensory histidine kinase in two component regulatory	conserved hypothetical protein	uronate isomerase	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)	MFS family, shikimate and dehydroshikimate	putative glutathione S-transferase	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase	transport of long-chain fatty acids; sensitivity to phage T2,	NUP family, nucleoside transport	putative HAAAP family transport protein
H	beta-galactosidase, lac operon	putative NCS2 family transport protein (1st module)	PIT family, low-affinity phosphate transporter (1st module)	ABC superfamily (peri_bind) xylose transport	MIT family, Mg2+/Ni2+/Co2+ transport protein (Mg)	required for sulfate transport	NCS1 family, cytosine transporter (2nd module)	mechanosensitive channel	GntP family, high-affinity gluconate transporter GNT I	P-type ATPase family, Pb/Cd/Zn/Hg transporting	LctP transporter, L-lactate permease (1st module)	D-ribose high-affinity transport system; membrane-

Les 3 promoteurs de contrôle servent à mesurer les éventuelles dérives entre des incubations non concomitantes.

Chaque microplaque de la collection originale a été repiquée dans deux microplaques 96 puits stériles avec un peigne à « 48 dents » stérilisé à l'alcool et à la flamme. Chaque puits de la microplaque contenait 200 µl de milieu LB contenant 25 µg/L de kanamycine. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous une faible agitation (130 rpm; Thermo Scientific MaxQ 4000) pendant 12 h au sein du dispositif décrit précédemment (figure 3). Après incubation, 80 µl de glycérol 60% sont distribués dans chacun des puits. Les microplaques sont homogénéisées à l'aide de l'agitateur à microplaques Eppendorf MixMate (1200 rpm pendant 30 secondes) puis stockées à -80°C.

Par précaution, la banque a été dupliquée deux fois. On dispose ainsi d'une copie à partir de laquelle les tests seront réalisés et une seconde à titre de sauvegarde.

9.2. Criblage de la collection : recherche de promoteurs mineral-sensitive

Une fois la copie de la « banque » réalisée, l'activité des promoteurs a été évaluée de manière différentielle selon 4 modalités :

- Incubation dans le milieu seul MOPS
- Incubation en présence de suspensions colloïdales de nontronites N_{Au}-2 T2 (particule taille 2)
- Incubation en présence de GSH-N_{Au}2 T2 (gels dopés en particules de nontronite)
- Incubation en présence de GS

L'ensemble de l'expérimentation s'effectue en milieu MOPS car celui-ci assure la croissance de la souche *E.coli* K12 MG1655 et ne possède aucune propriété d'auto-fluorescence.

Pour les 21 microplaques de la banque, 4 microplaques correspondant aux 4 modalités ont donc été réalisées. Une contenant uniquement 200 µl de MOPS, une deuxième contenant 152 µl de MOPS + 48 µl de nontronite N_{Au}-2 taille 2 (même quantité qu'au sein d'un GSH), une troisième contenant 200 µl de MOPS + un gel de silice hybride GSH-N_{Au}2 T2 (synthétisé selon la méthode décrite précédemment) et une quatrième contenant 200 µl de MOPS + un gel de silice pur. Toutes ont été réalisées avec le système de pipetage automatique Eppendorf epMotion 5070.

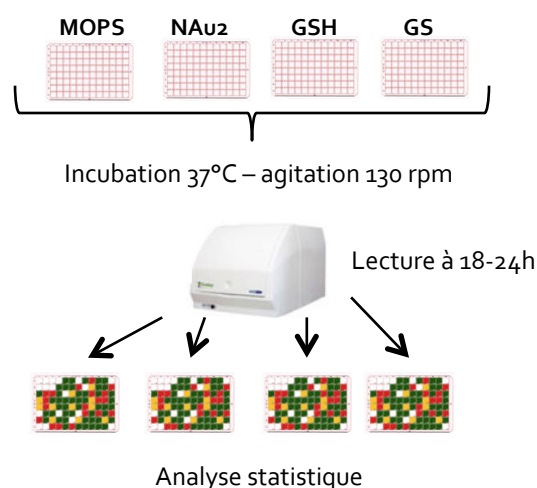


Figure 12 : Représentation schématique du criblage de la collection de promoteurs

Chaque clone a été précultivé au sein d'une microplaque 96 puits dans 200 µl de MOPS (25 µg/ml de Kanamycine) à 37°C sous une faible agitation (130 rpm; Thermo Scientific MaxQ 4000) pendant 12h puis inoculé au 1/10 dans chaque modalité. Chaque microplaque a ensuite été incubée à 37°C (130 rpm; Thermo Scientific MaxQ 4000) pendant 18h.

Après incubation, chaque microplaque correspondant à chaque modalité est homogénéisée à l'aide de l'agitateur à microplaques Eppendorf MixMate (1200 rpm pendant 30 secondes) puis un point de fluorescence est effectué avec le spectrofluorimètre *FLX-Xenius*® SAFAS selon les paramètres suivant :

- Longueur d'onde d'excitation : 485 nm
- Longueur d'onde d'émission : 510 nm
- Bande passante Excitation/Emission : 10 nm
- Tension du photomultiplicateur (PM) : 800 V
- Temps de mesure par puits : 0.2 s

9.3. Classification des réponses

Après la mesure des niveaux d'expression de chaque promoteur par fluorescence, une méthode de classification de type K-means a été appliquée. La méthode des *K-means* est une méthode itérative assez simple de partitionnement de données, qui quel que soit son point de départ converge vers une solution. Elle permet de répartir une collection d'objets o_j ($1 \leq j \leq N$) en K classes, le nombre étant fixé par l'utilisateur. L'algorithme des *k-means* est le suivant:

- 1- Choisir K objets au hasard parmi les objets de la collection. Soient (R_1, \dots, R_K) les objets ainsi obtenus. (R_1, \dots, R_K) sont les représentants des K classes (C_1, \dots, C_K) qui sont pour l'instant vides.
- 2- Affecter chaque objet de la collection à l'une des classes en fonction du représentant le plus proche :

$$\operatorname{argmin}_{k, 1 \leq k \leq K} d(o_j, R_k) \text{ où } d \text{ est une distance ou une similarité entre objets.}$$

- 3- Calculer de nouveaux représentants pour les classes. Ces nouveaux représentants correspondent à la moyenne des objets de la classe :

$$\forall k, 1 \leq k \leq K, R_k = \frac{1}{|C_k|} \sum_{j, o_j \in C_k} o_j$$

- 4- Retourner à l'étape 2 tant que la différence $\Delta(R)$ entre les anciens et les nouveaux représentants est supérieure à un seuil ε fixé (arbitrairement petit).

Dans ce travail, Les critères d'arrêt de l'algorithme dans notre cas sont $\varepsilon = 10^{-6}$ ou 1000 itérations. Dans notre cas, le nombre de classes (K) nécessaires n'a pas dépassé

La partition obtenue par l'algorithme des *k-means* dépend des représentants initialement choisis. De façon à s'affranchir en partie de cette dépendance, l'algorithme (*k* et *d* étant fixés) est exécuté à plusieurs reprises avec des initialisations différentes. Au terme des répétitions (50 dans notre cas), la meilleure partition est retenue selon les critères de l'utilisateur.

Bibliographie

- Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:2240–2246.
- Banin, E., Vasil M.L., Greenberg E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 102, 11076-81
- Choi, K. H., A. Kumar, and H. P. Schweizer. 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* 64:391–397.
- Choi, K. H., Schweizer H. P. (2007) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Protocols* 1, 153-159.
- Chu J, Haynes RD, Corbel SY, Li P, González-González E, Burg JS, Ataie NJ, Lam AJ, Cranfill PJ, Baird MA, Davidson MW, Ng HL, Garcia KC, Contag CH, Shen K, Blau HM, Lin MZ. 2014. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat Methods* 11:572–578
- Delineau Th. 1994. Les argiles kaoliniques du bassin des Charentes (France) Analyses typologiques, cristallographiques, spéciation du fer et applications. Thesis INPL, Nancy, France.
- De Donato, Ph., Villiéras F., Barres O. and Yvon J., 1993. Sur la possibilité d'observer les vibrations de valence OD aux dilutions naturelles : apport de la spectrométrie IRTF en réflexion diffuse. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 316, Série II, 1757 – 1762
- Esnault, L., 2010. Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères: conséquences sur l'évolution à long terme des matériaux d'un stockage de déchets radioactifs en milieu argileux. Thèse de Doctorat de l'université Henri Poincaré (Nancy 1) 258p.
- Ghysels, B., Min Dieu B.T., Beatson S.A., Pirnay J.P., Ochsner U., Vasil M.L., Cornelis P. 2004. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology-sgm*, vol. 150, no. 6, pp. 1671-1680.
- Grybos, M., Michot, L.J., Skiba, M., Billard, P., Mustin, C., 2010. Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. *Journal of colloid and interface science* 343, 433–8.
- Grybos, M., Billard, P., Desobry-Banon, S., Michot, L.J., Lenain, J.F., Mustin, C., 2011. Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. *Journal of colloid and interface sciences* 362, 317–24.
- Hoang, T.T., Kutchma, A.J., Becher, A. Schweizer, H.P. (2000) Integration-Proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: Site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 43, 59–72
- Jaisi, D.P., Kukkadapu, R.K., Eberl, D.D., Dong, H., 2005. Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 5429–5440.

- Jaisi, D.P., Dong, H., Kim, J., He, Z., Morton, J.P., 2007. Nontronite particle aggregation induced by microbial Fe(III) reduction and exopolysaccharide production. *Clays and Clay Minerals* 55, 96–107.
- Jaisi, D.P., Dong, H., Liu, C., 2007. Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 1145–1158.
- Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY, Lin MZ. 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9, 1005–1012
- Lutz R, Bujard H. 1997. Independent and Tight Regulation of Transcriptional Units in *Escherichia Coli* Via the LacR/O, the TetR/O and AraC/11-12 Regulatory Elements. *Nucleic Acids Res.* 25:1203–1210.
- Merola, R., McGuire, M. M., 2009. Crystallographic site distribution and redox activity of Fe in nontronites determined by optical spectroscopy. *Clays and Clay Minerals* 57(6), 771-778.
- Michot, L.J., Bihannic, I., Maddi, S., Baravian, C., Levitz, P., Davidson, P., 2008. Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the i/n transition. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24, 3127–39.
- Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE. 2000. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 13:1243–1250.
- Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil ML. 2002. GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 45 :1277–1287.
- O'Reilly, S. E., Furukawa, Y., Newell, S., 2006. Dissolution and microbial Fe (III) reduction of nontronite (NAu-1). *Chemical Geology* 235, 1-11.
- Oulkadi, D., Yemloul, M., Desobry-Banon, S., Canet, D., 2013. Water behavior in hybrid silica gels as studied by ¹H Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers. *Microporous and Mesoporous Materials* 172, 213-216.
- Oulkadi, D. , 2013. Gels de silice hybrides dopés en particules colloïdales de smectites pour l'étude des interactions bactérie/silicate. Thèse de doctorat de l'Université Lorraine (Nancy 1). 180p.
- Perronnet, M., 2004. Réactivité des matériaux argileux dans un contexte de corrosion métallique: Application au stockage des déchets radioactifs en site argileux. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1). 283p.
- Rochat L, Pechy-Tarr M, Baehler E, Maurhofer M, Keel C. 2010. Combination of fluorescent reporters for simultaneous monitoring of root colonization and antifungal gene expression by a biocontrol pseudomonad on cereals with flow cytometry. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 23:949–961
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York,).
- Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5:545–551.
- Strack RL, Bhattacharyya D, Glick BS, Keenan RJ. 2009. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *BMC Biotechnol.* 9.

- Stucki, J.W., 2011. A review of the effects of iron redox cycles on smectite properties. *Comptes Rendus Geoscience* 343, 199–209.
- Stumm, W., 1992. Solid-water interface. Processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems. John Willey, 427p.
- Zaslaver, A. ; Bren, A.; Ronen, M. ; Itzkovitz, S.; Kikoin, I.; Shavit, S.; Liebermeister, W.; Surette, M. & Alon, U. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*, August 2006, vol 3 n°8.

Chapitre 1 : Approche multilinéaire pour l'estimation de la réponse de biosenseurs fluorescents au fer (III)

Afin de développer une méthode générale d'identification des interactions bactérie-minéral à l'aide de biosenseurs, cette partie du travail de recherche a été organisée autour de « problèmes types » relevant de l'usage des biosenseurs bactériens dans des environnements naturels. Chaque problème est abordé sous un angle expérimental, tenant compte des paramètres biologiques et spectroscopiques, afin d'optimiser l'acquisition et l'interprétation des signaux fluorescent émis par des biosenseurs bactériens connus.

Généralement, les signaux de fluorescence mesurés résultent des combinaisons des spectres des sources de fluorescence (fluorophores ou biosenseurs) composant une suspension particulaire ou cellulaire. Sous cette forme brute, ces signaux compliqués ne présentent que peu d'intérêt et l'on est souvent tenté d'en extraire sans précaution quelques bandes spectrales et de les interpréter *in extenso*. Il est bien plus pertinent de disposer des spectres des sources et d'estimer leur contribution au spectre global, en utilisant des outils d'analyse numérique des spectres. Ces outils mathématiques de traitements des signaux ont trois fonctions essentielles : débruitage des signaux, séparation sans *a priori* des sources et modélisation des contributions.

Ainsi cette première partie du travail est focalisée sur l'étude de biosenseurs fluorescents modèles et l'utilisation algorithmes de traitements du signal existants afin de déterminer la capacité de combinaisons de biosenseurs à fournir une information quantitative sur perception de stress environnementaux dans un système bactérie-solution. La variabilité des réponses systémiques nécessaire aux procédures de traitement du signal est apportée par des plans d'expériences spécifiques générant un comportement différentiel des biosenseurs fluorescents. Par exemple, les proportions relatives des biosenseurs et les quantités ou qualités de substrats (e.g. la quantité de fer initiale) sont variées. Les résultats obtenus sur ces systèmes simples serviront dans un deuxième temps, à dimensionner les biosenseurs, les expériences et les algorithmes afin d'identifier les interactions bactérie-particule en suspension (*Cf chapitre II*).

Pour étudier les réponses systémiques, il faut disposer d'une méthode expérimentale et d'analyse multidimensionnelle, c'est-à-dire une technique capable d'intégrer simultanément différentes variables du système bactérie-solution étudié. Cette méthode s'appuie sur :

- Des biosenseurs bactériens fluorescents multicolores, construit à partir de promoteurs dont l'activité témoigne des interactions entre les cellules et le milieu environnant.
- Un environnement ou milieu variant ou fluctuant, source de variabilité pour le système rapporteur
- Des mesures spectroscopiques précises assurant à la fois un suivi qualitatif et quantitatif des transformations physico-chimiques que subit le système et des réponses des biosenseurs
- Des algorithmes robustes de traitement des signaux de fluorescents

1. Construction de biosenseurs multicolores

Pour répondre au besoin des analyses multilinéaires, une série de biosenseurs multicolores ont été construits en insérant au droit des promoteurs d'intérêt des séquences codant la production de protéines fluorescentes. Actuellement, les protéines fluorescentes sont les seuls marqueurs spontanément fluorescents qui peuvent être codés génétiquement. Hormis la présence d'oxygène (O₂), pour la plupart d'entre-elles, leur maturation et leur fluorescence ne nécessitent pas de cofacteurs particuliers (Tsien, 1998).

La découverte de la Green Fluorescent Protein (GFP) dans des extraits de la méduse *Aequoria victoria* en 1962 par Osamu Shimomura a véritablement révolutionné la recherche en biologie. Les avancées successives par le clonage du gène codant la GFP, son expression dans d'autres organismes par l'optimisation des biais de codons, l'amélioration de la stabilité thermique... ont facilité son utilisation dans de nombreux domaines, en particulier en imagerie biomédicale ou l'interprétation quantitative des signaux est déterminante. La découverte ultérieure d'autres protéines fluorescentes GFP-like (e.g. protéine fluorescente rouge DsRed de *Discosoma stratia*) a amené aussi à la production de nombreux variants présentant de nouvelles propriétés spectrales, physico-chimiques ou biochimiques. Aujourd'hui, les protéines fluorescentes (PF) offrent la possibilité de suivre des processus ou réactions biochimiques *in vivo* à l'échelle moléculaire, de la cellule, voire de l'organisme entier (Lippincott-Schwartz et al. 2004). De nombreux biosenseurs à base de PFs ont été développés pour la mesure à l'échelle cellulaire d'activités enzymatiques, de paramètres physiologiques cellulaires (pH, redox, gradients ioniques) ou le suivi de métabolites (glucose,...). Enfin, avec l'émergence des illuminations lasers (mono ou multi-photons, en mode pulsés ou continus) et des imageries à haute fréquence et haute résolution, des protéines photo-activables ou photo-commutables ont vu le jour (Lukyanov, K. A. et al. 2005). En biophysique via les techniques de type PALM (Photoactivated Localization Microscopy), ces protéines permettent d'ores et déjà de réaliser des « single molecule tracking », i.e. de suivre de le cheminement intermittent de molécules dans le cytoplasme (Elowitz et al. 1999 ; Ando et al. 2004 ; Tulu et al. 2004 ; Shav-Tal et al. 2004).

1.1. Les protéines fluorescentes utilisées

Aujourd'hui, il existe une collection très étendue de protéines fluorescentes homologues à la GFP ou à la RFP (issus de la DsRed) et de nombreux variants aux propriétés spectrales modifiées (Chudakov et al. 2010 ; Day et al. 2009). Les propriétés d'émission de ces variants spectraux sont liées à la position et à la nature du résidu aromatique (tyrosine, tryptophane, phénylalanine ...) au niveau du chromophore. Toute substitution ou déplacement conduit à une modification de la structure chimique du chromophore. La modification de la nature des acides aminés entourant le chromophore induit également des changements des propriétés spectrales des protéines. Ainsi, grâce à la mutagenèse dirigée ou aléatoire d'un ou de plusieurs acides aminés dans les séquences primaires de la GFP et de la RFP, il a été possible de créer deux groupes de protéines variants dont l'émission couvre l'ensemble du domaine visible. Les variants de GFP-like émettent principalement entre le violet (420nm) et le jaune (530 nm) alors que ceux de la RFP émettent dans le domaine orange-rouge entre 550 et 650 nm. Il existe aussi des dérivés Red-Green de la GFP émettant à la fois dans le vert (510nm) ou le rouge (580 nm), en fonction de la longueur d'onde d'excitation employée. Comme l'indique la Figure 17, la brillance des protéines est optimale pour des émissions comprises entre 500 et 550 nm (vert-jaune). Cette zone de brillance optimale correspond aussi à un déplacement de Stokes minimum de l'ordre de 10 à 20 nm, comme l'indique la courbe de tendance de la Figure 1. En d'autres termes, les spectres d'émission des protéines les plus brillantes se chevauchent fortement. Leur niveau d'émission intense ne facilite donc pas leur séparation spectrale. A l'inverse, les domaines à plus faibles ou plus fortes longueurs d'ondes sont plus favorables à l'obtention de signaux de fluorescence distincts, mais de plus faibles intensités.

Les recherches actuelles entreprises sur les FP se focalisent sur l'élaboration de monomères stables émettant dans le rouge lointain et le proche IR. En effet, dans ce domaine d'absorption/émission, les photons sont peu absorbés et pénètrent plus profondément dans les

structures cellulaires et tissulaires. De plus, les risques d'émission de signaux IR issus de l'autofluorescence cellulaire sont significativement réduits. Même si le shift de Stokes augmente significativement, la brillance des PFs rouges diminue considérablement, ce qui réduit fortement leur contribution spectrale dans des mélanges multicolores.

Il sera démontré un peu plus loin que la spectroscopie synchrone (cf § 3) permet de contourner en partie ces difficultés techniques.

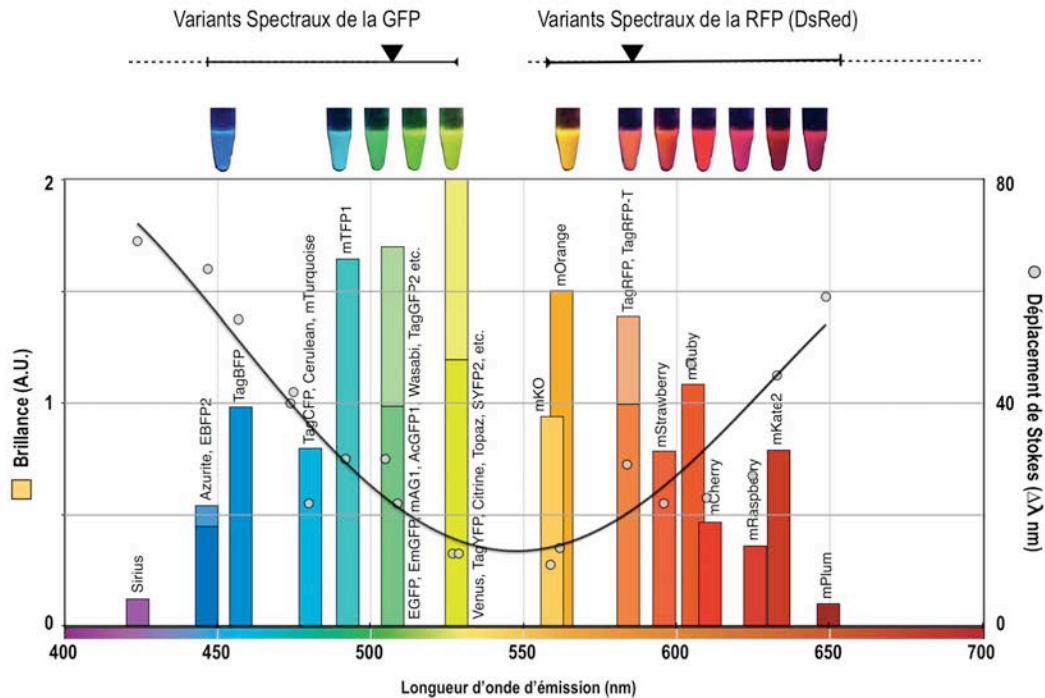


Figure 17 : Variations des propriétés spectrales des protéines fluorescentes monomériques dérivées de la GFP et de la RFP. Leur brillance *in vitro* respective (= rendement quantique * Coefficient d'extinction molaire) et leur déplacement de Stokes (= écart entre les maxima d'émission et d'excitation) sont indiqués en fonction de la longueur d'onde. Une courbe de tendance est ajustée aux « shifts » de Stokes des protéines répertoriées. (D'après Chudakov et al. 2010)

1.2. Les vecteurs utilisés

Actuellement, les protéines peuvent être exprimées seules ou fusionnées à d'autres protéines d'intérêt dans divers micro-organismes. Les séquences codantes peuvent être introduites au droit de gènes d'intérêt soit par insertion de plasmides multi-copie ou par insertion chromosomique.

L'insertion chromosomique, effectuée par exemple à l'aide de transposons (Type mini-Tn7), est plus stable, mais le rendement d'expression reste faible puisqu'une seule copie du gène est présente. En revanche, l'emploi de systèmes plasmidiques présente des avantages (cf § 4.2). Certains vecteurs sont à large spectre d'hôtes, ce qui autorise l'insertion des systèmes senseurs dans des espèces bactériennes très différentes. Cette portabilité des constructions fluorescentes est importante. De plus, la présence de plusieurs copies de plasmides dans la cellule génère une amplification du signal de fluorescence. Malgré tout, cette portabilité ne permet pas de s'affranchir des variations d'expression entre espèces ou au sein d'une même espèce.

Pour une même souche, à l'échelle de la cellule, les expressions des protéines fluorescentes ont des distributions très variables, même lorsqu'elles sont sous contrôle d'un même promoteur (Figure 18). Leur accumulation dans le cytoplasme est aussi à l'origine de certaines variations phénotypiques des lignées cellulaires, par exemple en taille et en forme.

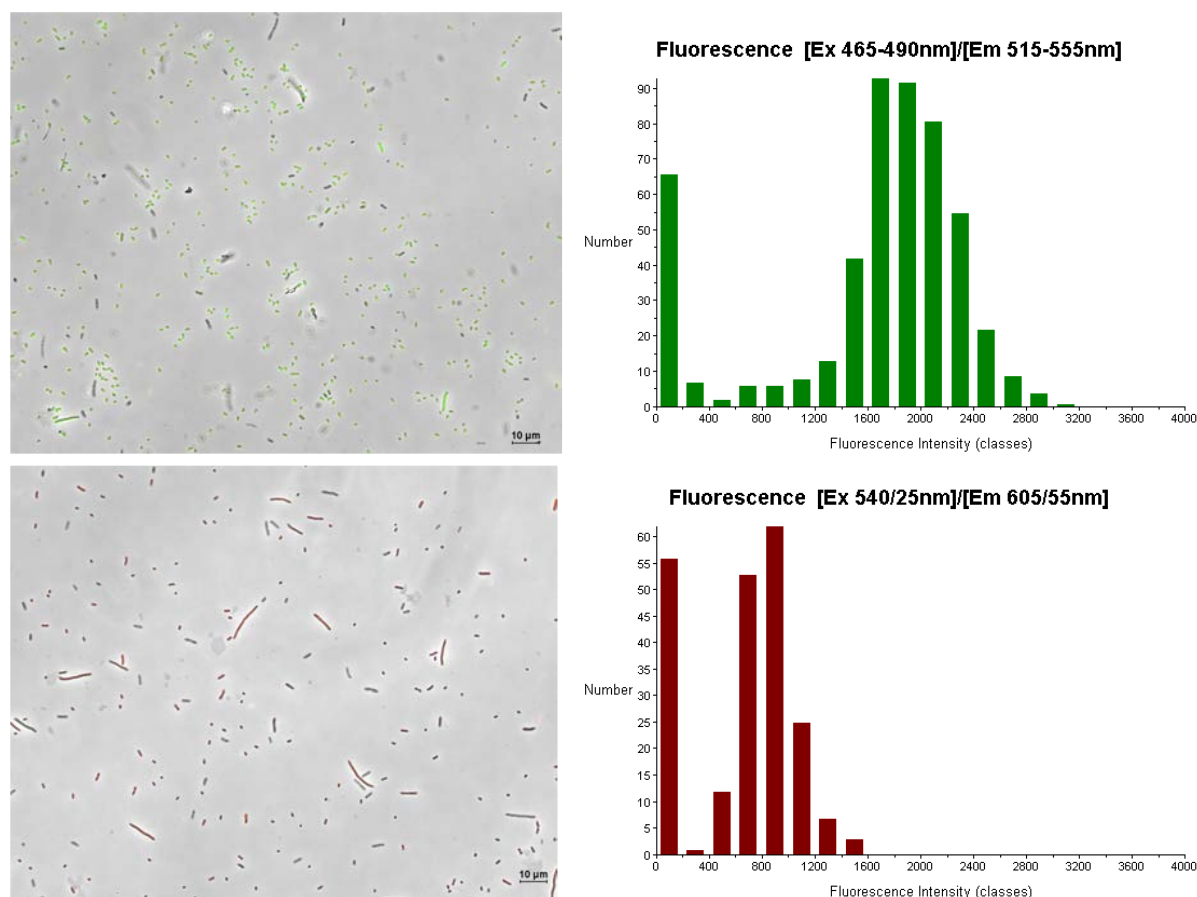


Figure 18 : Observation en microscopie de fluorescence de l'expression différentielle de la GFP (haut) et de E2_orange (bas) chez *Pseudomonas putida* KT2440 (expression constitutive). Les histogrammes représentent la distribution de l'intensité moyenne de la fluorescence cellulaire sur les populations observées.

2. Analyse multidimensionnelle de mélange de signaux fluorescents

En chimiométrie, il existe de nombreux outils d'analyse numérique permettant d'estimer, avec plus ou moins de précision, la contribution de sondes fluorescentes aux signaux ou spectres d'un mélange donné (Bro et al. 1997 ; Bro et al. 2006 ; Smilde et al. 2005). Ces algorithmes ont des bases algébriques ou statistiques et reposent sur des décompositions linéaires ou multilinéaires des signaux. L'hypothèse de départ est toujours la même : le spectre brut est une combinaison linéaire de spectres de fluorescence des différents composants fluorescents du mélange. Si cette hypothèse est vérifiée, les coefficients de mélange, formant la combinaison sont donc proportionnels aux contributions de chaque source.

Dans le travail de thèse réalisé par Fabrice Caland (2013), la modélisation de signaux de fluorescence émis par des biosenseurs par des méthodes de décomposition de tenseurs avec gestion des dépendances linéaires a été étudiée attentivement. Comme en chimiométrie, l'hypothèse retenue est de considérer le problème de modélisation du comportement de biosenseurs fluorescents dans un système bactérie-solution comme un problème de séparation d'un mélange de sources, i.e. des signaux émis par le système ou constitutifs du système. Ces sources de fluorescence peuvent correspondre à la fois à des signaux connus et volontairement introduites dans le système (e.g. signature spectrale des biosenseurs) ou à des signaux inconnus ou soupçonnés émis par les métabolites produits ou des composés fluorescents résiduels du milieu. L'estimation de réponses fonctionnelles de biosenseurs bactériens par ces méthodes revient donc à déterminer les combinaisons linéaires des spectres « sources » et évaluer les contributions de chaque source. La réponse de chaque promoteur est donc directement modélisée par l'évolution des coefficients de mélange des sources.

La seule contrainte pour utiliser ces techniques est de disposer de données multidimensionnelles, c'est à dire d'un jeu de mesures spectrales $I(\lambda)$ en fonction de plusieurs paramètres : $I(\lambda) = F(\text{paramètre1}, \text{paramètre 2}, \dots, \text{paramètre n})$.

2.1. Données multidimensionnelles et tenseurs

L'obtention de données multidimensionnelles est assez aisée dès qu'on utilise des microplaques de titration comme dispositif expérimental et support de mesures. Il est facile d'obtenir, par exemple, des mesures spectrales mono, bi ou tri-paramétriques.

Dans chaque puits, on réalise un spectre de fluorescence sur des échantillons variant en fonction de 1, 2 ou 3 paramètres.

Des plans d'expériences bi-paramétriques (p1,p2) vont ainsi générer des données tri-variées $[\lambda, p1, p2]$; les deux paramètres p1, p2 varient en plus de la longueur d'onde λ . En exploitant la géométrie de la microplaque, la façon la plus commode de faire varier les deux paramètres est de les croiser selon les lignes et les colonnes (figure 2-1).

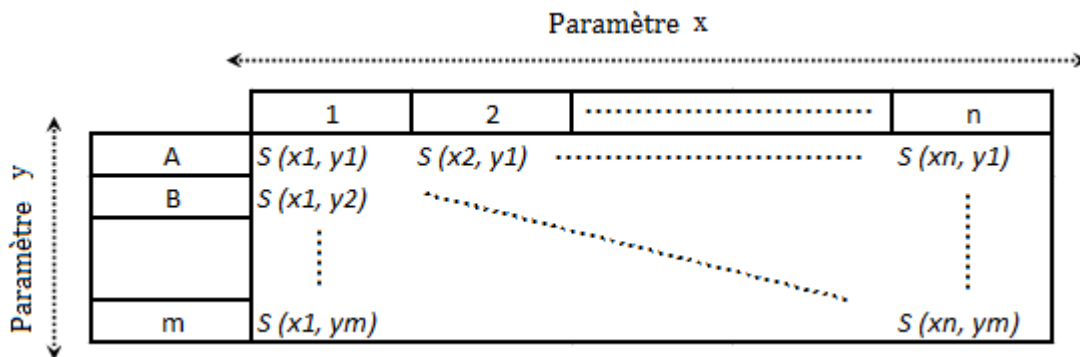


Figure 19 : Matrice expérimentale pour la production de données trilineaires à partir de microplaques. $S(x, y)$ représente le spectre mesuré selon la condition définie par les paramètres x et y .

Pour leur analyse, les données multidimensionnelles sont représentées sous la forme de tenseurs χ d'ordre supérieur qui sont la généralisation des vecteurs et des matrices. Un vecteur est un tenseur d'ordre 1 tandis qu'une matrice est un tenseur d'ordre 2. Un tenseur d'ordre supérieur est représenté par : $\chi \in R^{I(1)*I(2)*...*I(N)}$ où N désigne l'ordre du tenseur ($N > 2$).

L'utilisation de tenseur d'ordre supérieur a donné lieu à une terminologie différente de celle utilisée pour décrire les données d'une base de données bidimensionnelle. Ainsi chaque dimension d'un tenseur d'ordre supérieur est appelée mode et le nombre de variables de chaque mode est utilisé pour définir la dimensionnalité d'un mode. Chaque entrée d'un tenseur X est noté $x_{i1...iN}$. Aux dimensions supérieures, les lignes et les colonnes sont généralisées, on parle alors de fibres de mode 1 (colonne), de mode 2 (ligne), de mode 3 (tube)... (Figure 20)

Considérant un tenseur d'ordre 3, l'entrée x_{ijk} représente donc l'élément de la $i^{\text{ème}}$ ligne, $j^{\text{ème}}$ colonne et du $k^{\text{ème}}$ tube .

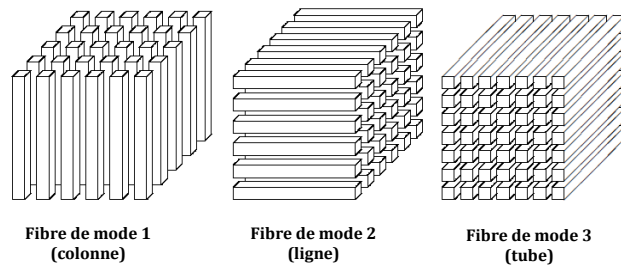


Figure 20: Fibres d'un tenseur d'ordre 3 (d'après Kolda, T. G., & Bader, B. W. 2009).

Les modèles multilinéaires les mieux étudiés et les plus communément utilisés sont le modèle de Tucker3 et les modèles PARAFAC (PARAllel FACTor analysis) ou CANDECOMP (CANonical DECOMPosition). Ces deux types de modèles peuvent être considérés comme une généralisation des méthodes d'analyses bidimensionnelles standards que sont la décomposition en valeur singulière de matrice (DVS) ou l'analyse en composantes principales (ACP) aux dimensions supérieures (Acar et Yener 2009). Pour notre étude, le modèle de Tucker ne convient pas car pour un même jeu de données, il existe plusieurs modèles équivalents possibles (en termes de fitting) faisant intervenir des interactions entre variables différentes à chaque fois. Quel est celui qui correspond aux structures réelles ? Il est possible, par une succession de transformations, de modifier le tenseur de core et de s'approcher d'un core super-diagonalisé (cf. Modèle Camdecomp/Parafac) pour s'approcher de l'unicité mais il est mathématiquement impossible d'y arriver complètement (Kolda et Bader 2009).

Par souci de commodité, nous ferons par la suite référence au modèle CANDECOMP/PARAFAC sous la dénomination de méthode ou modèle CP.

2.2. Modèle CANDECOMP/PARAFAC (CP)

Le modèle CP est basé sur le principe de Cattell : les profils proportionnels et parallèles (Cattell 1944). D'un point de vue mathématique, un modèle CP est le résultat de la factorisation (décomposition) d'un tenseur d'ordre N en une combinaison linéaire de tenseurs d'ordre N de rang 1 (Figure 21). Un tenseur d'ordre N ($\mathcal{X} \in R^{I_{(1)} \times I_{(2)} \times \dots \times I_{(N)}}$) est dit de rang 1 s'il est possible d'écrire ce dernier sous la forme d'un produit dyadique de N vecteurs :

$$\mathcal{X} = a^{(1)} \circ a^{(2)} \circ \dots \circ a^{(N)} \quad \text{Équation 1}$$

où le symbole « \circ » représente le produit dyadique. Cela signifie que chaque élément du tenseur est le produit des vecteurs correspondants (Figure 22):

Pour tout $1 \leq i_n \leq I_n$.

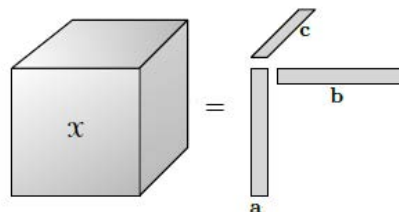


Figure 21 : Tenseur d'ordre 3 de rang 1, $X = a \circ b \circ c$. L'élément (i, j, k) de X est donné par $x_{ijk} = a_i b_j c_k$.

Considérant un tenseur d'ordre 3 $\chi \in R^{I \times J \times K}$, un modèle CP extrait trois matrices composantes, $A \in R^{I \times R}$, $B \in R^{J \times R}$ et $C \in R^{K \times R}$ référant à la combinaison des vecteurs éléments a_{ir} , b_{jr} , c_{kr} qui décrivent le comportement des R facteurs selon les trois modes A, B et C, i.e $A = [a_1 a_2 \dots a_r]$, $B = [b_1 b_2 \dots b_r]$, $C = [c_1 c_2 \dots c_r]$. Le modèle CP prend alors la forme de l'équation (2) suivante :

$$x_{ijk} = \sum_{r=1}^R a_{ir} \cdot b_{jr} \cdot c_{kr} + e_{ijk} \quad \text{Équation 2}$$

Pour $i = [1, \dots, I]$; $j = [1, \dots, J]$; $k = [1, \dots, K]$ où R est le nombre de facteurs extraits dans chaque mode, a, b, c un tenseur d'ordre 3 de rang 1 pour lequel les vecteurs a, b et c forment les colonnes des matrices composantes A, B et C , et e_{ijk} un tenseur d'ordre 3 représentant les termes résiduels (les données non incluses dans la décomposition).

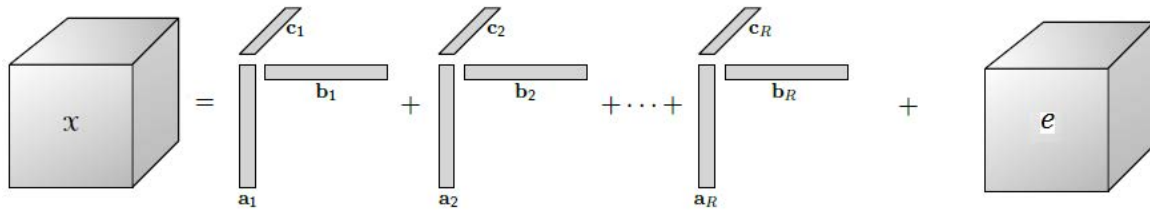


Figure 22 : Décomposition CP d'un tenseur d'ordre 3. Un tenseur d'ordre 3 X est décrit comme la somme de R tenseurs d'ordre 3 de rang 1 (R facteurs) (d'après Kolda, T. G., & Bader, B. W. 2009).

Les tenseurs d'ordre supérieur possèdent une propriété très attractive qui est la possibilité d'obtenir une décomposition en rang unique, alors que la décomposition de matrices ne l'est jamais (Sidiropoulos et Bro, 2000 ; Ten Berge 2000). La première preuve d'unicité d'un modèle obtenu par la méthode CP a été apportée en 1970 par Harshman (1970). Considérant la matrice de rang R $X \in \mathbb{R}^{I \times J}$ alors sa décomposition en rang sera :

$$X = AB^T = \sum_{r=1}^R a_r \circ b_r \quad \text{Équation 3}$$

Sa décomposition en valeur singulière donnera :

$$X = U\Sigma V^T \quad \text{Équation 4}$$

où $U \in \mathbb{R}^{I \times I}$ est une matrice unitaire, $\Sigma \in \mathbb{R}^{I \times J}$ est une matrice orthogonale dont les valeurs (nombre réel positif) de la diagonale sont les valeurs singulières de X , et V^T la matrice transposée de $V \in \mathbb{R}^{J \times J}$, une matrice unitaire.

Alors on peut définir :

$$A = U\Sigma \quad \text{et} \quad B = V$$

Cependant, il est tout aussi juste de définir A et B comme suit :

$$A = U\Sigma W \quad \text{et} \quad B = VW$$

où W est une matrice orthogonale (de taille $R \times R$) quelconque.

Ainsi, il est possible de construire deux ensembles de matrices de rang 1 dont la somme est égale à la matrice d'origine X . La décomposition en valeur singulière de matrice DVS d'une matrice est unique seulement par l'addition de contraintes d'orthogonalité. L'unicité signifie donc qu'il existe un unique ensemble de matrices de rang 1 dont la somme est égale à la matrice d'origine. La décomposition CP est en revanche unique avec des contraintes moins importantes, exception faite des indéterminations élémentaires de permutation ou d'échelle. Considérons le tenseur d'ordre 3 suivant :

$$\chi = \sum_{r=1}^R a_r \circ b_r \circ c_r = [[A, B, C]] \quad \text{Équation 5}$$

Brièvement, l'indétermination de permutation réfère à la possibilité de réorganiser les matrices de rang 1 de manière arbitraire par l'utilisation de matrices de permutation, i.e.

$$\chi_{\pi} = [[A, B, C]] = [[A\Pi, B\Pi, C\Pi]]$$

Où π est une matrice de permutation de taille $R \times R$.

L'indétermination d'échelle réfère quant à elle à la possibilité de multiplier les vecteurs a_r , b_r et c_r par des facteurs α , β , γ quelconques tant que $\alpha\beta\gamma = 1$

$$\mathcal{X} = \sum_{r=1}^R (\alpha_r a_r) \circ (\beta_r b_r) \circ (\gamma_r c_r)$$

Pour $r = 1, \dots, R$.

En 1977, Kruskal identifia une condition suffisante pour assurer l'unicité d'une décomposition CP basé sur le concept de rang-k (Kruskal 1977, 1989). Le rang-k d'une matrice A , noté k_A , est défini comme étant le nombre de colonnes linéairement indépendantes. La condition suffisante d'unicité de la décomposition CP à R facteurs d'un tenseur d'ordre 3 est la suivante :

$$k_A + k_B + k_C \geq 2R + 2 \quad \text{Équation 6}$$

L'unicité de la décomposition CP est imposée par les restrictions du modèle. La restriction la plus significative concerne la possibilité d'interaction entre les facteurs des différents modes. Concernant les modèles multilinéaires CP, le tenseur de cœur, qui représente l'ensemble des interactions entre les modes, est super-diagonalisé, i.e. les interactions sont nulles en dehors de l'hyper-diagonale (Kolda et Bader 2009). Cette contrainte rend l'interprétation des modèles CP particulièrement aisée mais interdit d'extraire un nombre différent de facteur dans chaque mode.

En raison de l'unicité des solutions trouvées sous faibles contraintes, et de la facilité d'interprétation des modèles obtenues, la méthode CP est à ce jour la méthode d'analyse multilinéaire la plus utilisée pour le traitement et l'analyse des signaux de fluorescence.

2.3. Avantages de la méthode CP pour une analyse systémique via des biosenseurs

Comme présenté en introduction, l'objectif méthodologique de la thèse est de développer une méthode d'analyse d'un mélange de signaux de fluorescence (sources) émis par des biosenseurs et représentant chacun l'expression d'un gène particulier ou l'activité d'un promoteur. La finalité de cette démarche est double : (i) du point de vue « sensing », estimer conjointement les réponses de systèmes rapporteurs dans des environnements variant (vision senseurs) (ii) d'un point de vue biologie des systèmes, identifier un ensemble de structures d'expression génétique réagissant le mieux à la texture (i.e. la composition et la structure) de l'environnement cellulaire. Le présent travail propose donc d'associer l'analyse spectrométrique des réponses de biosenseurs bactériens fluorescents à une méthode de décomposition multilinéaire de type CP. La décomposition polyadique sans *a priori* (i.e. sans connaissance préalable) des jeux de signaux de fluorescence permet à la fois d'identifier les différentes sources mixées qu'elles soient connues ou inconnues et d'estimer leur comportement respectif en fonction des variations imposés aux paramètres d'étude par l'expérimentateur.

Cette méthode de décomposition de tenseurs est aussi capable de gérer les interactions entre les différents biosenseurs. En effet, dans ces travaux, F. Caland a montré l'existence d'une condition

assurant l'unicité de la décomposition de tenseurs suivant le modèle CP y compris lorsqu'il existe une dépendance linéaire suivant les modes.

Dans son principe, cette méthode est similaire aux approches systémiques utilisées en biologie. En biologie des systèmes, l'environnement dans lequel évolue le système vivant est perturbé et l'état des parties du système doit être déterminé à différent instant t afin d'appréhender leur interaction, relation et coordination et de modéliser *in fine* la réponse adaptative du système. Ainsi, à partir d'un jeu de données multi-variées regroupant l'ensemble de spectres de fluorescence indiquant l'état des biosenseurs pour chaque variation des paramètres environnementaux, la décomposition CP modélisera le comportement multilinéaire des sources fluorescentes identifiées et donc la réponse adaptative de la cellule d'intérêt.

En d'autres termes, la méthode CP permet l'analyse conjointe d'un ensemble de signaux de fluorescence selon une approche multidimensionnelle globale.

3. La spectroscopie de fluorescence : apport de la mesure synchrone

Comme mentionné au § 1, le phénomène de fluorescence met en jeu deux mécanismes successifs : l'absorption de photons par des molécules fluorescentes (e.g. protéines GFP) et l'émission de photons de plus basse énergie par ces mêmes molécules. Ce décalage vers le rouge de l'émission (« Red shift ») est communément appelé décalage de Stokes ou shift de Stokes (Figure 17) . Le spectre de fluorescence obtenu caractérise à la fois la capacité des molécules à absorber et à émettre des photons sur une plage de longueurs d'onde donnée. Depuis les expériences de Stokes, ces deux mécanismes ont été abondamment étudiés dans le domaine spectral UV-vis et le proche IR.

3.1. Spectre d'émission et d'excitation

En spectroscopie de fluorescence, on procède classiquement de deux manières pour analyser un échantillon. La plus courante consiste en la réalisation d'un spectre d'émission, i.e. l'émission de fluorescence est balayée sur une gamme de longueurs d'ondes pour une longueur d'onde d'excitation fixée ($\lambda_{emx} \pm$ bande passante). Un réglage inverse permet la réalisation d'un spectre d'excitation, pour lequel l'intensité fluorescence est mesurée dans une bande spectrale établie ($\lambda_{em} \pm$ bande passante) tandis que l'échantillon est excité à différentes longueurs d'ondes. Quel que soit le mode utilisé, il ne peut jamais y avoir de chevauchement entre les longueurs d'onde d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}) : $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$.

En effet, considérant un échantillon fluorescent excité à une longueur d'onde λ' , $E_M(\lambda)$ le spectre d'émission normé, $R_{\lambda'}$ la radiance spectrale de l'échantillon, alors l'intensité du signal de fluorescence I mesurée à la longueur d'onde d'émission λ est décrit par l'équation suivante:

$$I(\lambda) = R_{\lambda'} \cdot E_M(\lambda) \quad \text{Équation 7}$$

$I(\lambda)$ désigne le spectre d'émission mesuré.

Pour un échantillon dilué, la loi de Beer-Lambert est valide et $R_{\lambda'}$ peut être exprimé de la manière suivante (Equation 8) :

$$R_{\lambda'} = k' Y_L(\lambda') I_0(\lambda') \varepsilon(\lambda') C L \quad \text{Équation 8}$$

où k' est une constante expérimentale qui dépend du dispositif de mesure, Y_L le rendement quantique, I_0 l'intensité de la longueur d'onde d'excitation, ε le coefficient d'extinction molaire, C la concentration de l'analyte et L le trajet optique.

Le produit $Y_L(\lambda') \cdot I_0(\lambda') \cdot \varepsilon(\lambda')$, représente la quantité de lumière absorbée par l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation fixée λ' , et est donc proportionnel au spectre d'excitation $E_X(\lambda)$ normé du composé :

$$k E_X(\lambda') = Y_L(\lambda') I_0(\lambda') \varepsilon(\lambda') \quad \text{Équation 9}$$

Le spectre d'émission mesuré s'écrit finalement avec la constante instrumentale $K = k'k L$:

$$I(\lambda) = K E_X(\lambda') E_M(\lambda) C \quad \text{Équation 10}$$

Dans le cas d'un mélange de N biosenseurs ou N fluorophores, comme l'excitation du mélange est une simple combinaison linéaire de l'absorbance des N constituants fluorescents, on peut écrire l'intensité mesurée sous la forme :

$$I(\lambda) = K \sum_{i=1}^N E_X^i(\lambda') E_M^i(\lambda) C_i \quad \text{Équation 11}$$

La constante instrumentale K , qui inclut le trajet optique du porte échantillon (cuve, puits de microplaque...), est dépendante des caractéristiques optiques de l'appareil (lampe, monochromateur ...) et des paramètres de mesures (gain des photomultiplicateurs, bande-passante...). Il n'est pas possible de la déterminer simplement, sans utiliser des éclairages et des échantillons calibrés. De toute façon cette correction instrumentale ne serait pas très utile, l'important étant que le dispositif de mesure soit fidèle, *i.e.* que les spectres sources soient conservés par la mesure.

3.2. Les matrices d'excitation et d'émission

La matrice d'excitation-émission de fluorescence (MEEF), aussi connue sous le nom de spectroscopie de fluorescence totale, permet de représenter sur un bloc diagramme, les intensités d'émission pour toutes les combinaisons de longueurs d'onde excitation et de longueur d'onde d'émission (Patra, 2003). Le diagramme peut être une surface topographique ou une surface isoplèthe. Ces analyses sont généralement réalisées en effectuant de manière successive des spectres d'émission à différentes longueurs d'ondes d'excitation. La Figure 23 présente une matrice d'excitation-émission pour un mélange de biosenseur, représentée par un diagramme isoplèthe. L'axe des abscisses correspond aux longueurs d'onde d'émission et l'axe des ordonnées aux longueurs d'ondes d'excitation tandis que l'échelle colorée (du bleu au rouge) représente l'intensité de fluorescence. Les analyses des MEEF demeurent intéressantes car elles permettent de caractériser un échantillon par sa diversité spectrale (Jiji et al. 1999 ; Patra et al. 2001 ; Marose et al. 1998 ; Teixeira et al. 2009).

La mesure de la fluorescence I_M se déduit simplement de l'équation 10 :

$$I_M(\lambda', \lambda) = K C E_X(\lambda') E_M(\lambda) \quad \text{Équation 12}$$

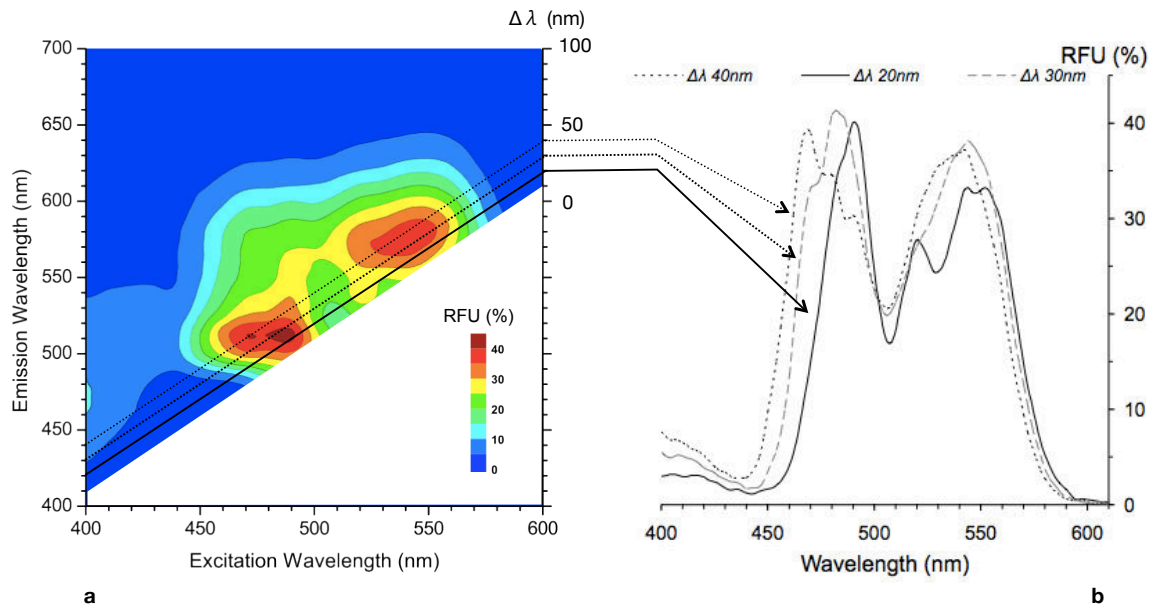


Figure 23: Diagramme isoplèthe représentant une matrice d'excitation-émission pour un mélange de 4 biosenseurs (DH10B-pPROBE-NT'lac, DH10B-pPRlacY495 ; pPRlacO561; pPRlacX591). - (a) Les lignes en pointillés figurant sur la MEEF correspondent aux spectres synchrones réalisés avec différents décalages de longueurs d'onde ($\Delta\lambda$) - (b) Spectres synchrones de fluorescence avec $\Delta\lambda$ allant de 20 à 40 nm

3.3. Mesure synchrone

Au-delà de ces mesures classiques, il existe une troisième possibilité proposée par Lloyd dès 1971 : balayer simultanément et de manière synchrone, la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) et la longueur d'onde d'émission (λ_{em}) avec un écart constant $\Delta\lambda$ (Lloyd, 1971). En se référant au MEEF, un spectre d'émission revient à se déplacer par exemple le long de l'axe des abscisses pour une valeur en ordonnée fixe (correspondant à l'excitatrice). Dans le cas d'un spectre synchrone, cela revient à se déplacer sur une diagonale de la matrice (trait en pointillés sur la Figure 23).

Comme l'indiquent les travaux de Tuan Vo Dinh (1978) sur le tétracène, un hydrocarbure polycyclique à 4 cycles, le balayage synchrone possède de nombreux avantages (Dinh, 1978) (Figure 24) :

- Une sensibilité accrue grâce à des bandes d'émission plus intenses et des spectres plus piqués, *i.e* une plus grande résolution
- Une uni-modalité quasi-systématique des spectres synchrones, qui facilite la reconnaissance explicite des composantes spectrales, *i.e* une sélectivité de l'information spectrale

Pour une excitation à 442 nm, le spectre d'émission du tétracène présente trois bandes assez fines et chevauchantes à 473 nm, 507 nm et 546 nm. Avec une émission mesurée à 507 nm, le spectre d'excitation obtenu présente quatre bandes à 470 nm, 442 nm, 416 nm et 397 nm. Le plus petit décalage de Stokes entre l'excitation et l'émission est donc de 3 nm. En réalisant un spectre synchrone avec un $\Delta\lambda$ de 3 nm, le tétracène présente une bande d'émission unique à 473 nm. Ce balayage annihile la contribution des autres combinaisons excitation/émission correspondant à des décalages de Stokes supérieurs à 10 nm. La bande synchrone est

effectivement plus intense et plus résolue que n'importe quelle bande du spectre d'émission ou d'excitation.

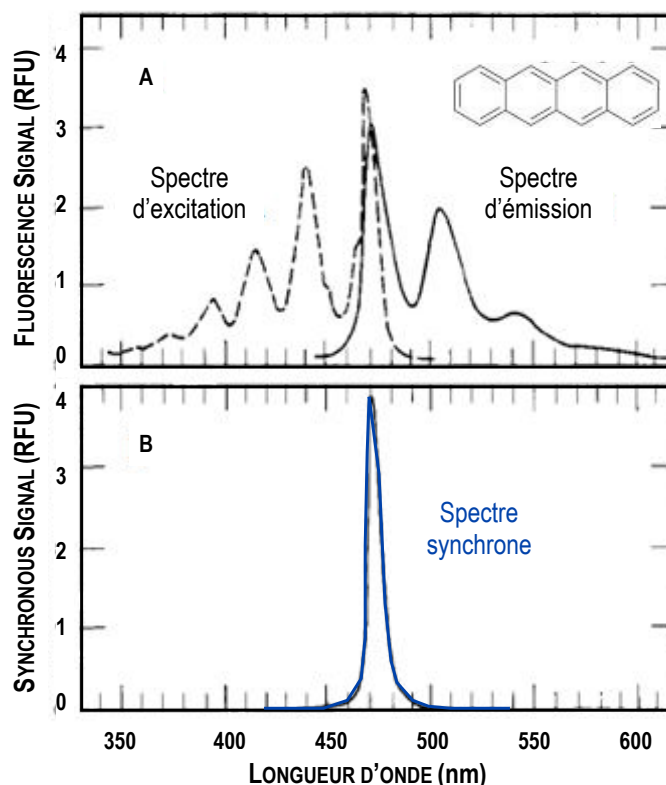


Figure 24 : Unimodalité et sensibilité des spectres synchrones - (A) Spectre d'excitation (ligne pointillée) pour $\lambda_{em} = 507$ nm et spectre d'émission (ligne pleine) pour $\lambda_{ex} = 442$ nm du tétracène. - (B) Spectre synchrone du tétracène avec $\Delta\lambda = 3$ nm. (D'après Tuan Vo-Dinh 1978)

La spécificité de la spectroscopie synchrone est de maintenir un écart constant $\Delta\lambda$ entre la longueur d'onde d'émission λ et la longueur d'onde d'excitation λ' : $\lambda - \lambda' = \Delta\lambda$
 L'intensité synchrone I_s ne dépend plus que d'un seul paramètre λ :

$$I_s(\lambda') = K C E_x(\lambda - \Delta\lambda) E_M(\lambda) \quad \text{Équation 13}$$

I_s résulte de la multiplication de deux spectres normés et non d'un seul comme en spectroscopie classique, ce qui engendre un piqué supérieur du spectre synchrone avec une largeur à mi-hauteur réduite (Figure 25).

On peut admettre, en première approximation, que les spectres d'émission ou d'excitation d'une population de molécules fluorescentes sont des sommes de fonctions gaussiennes.

$$E(\lambda) = \alpha e^{-\left(\frac{\lambda - \lambda_{max}}{n}\right)^2}$$

En d'autres termes, les spectres synchrones possèdent une largeur à mi-hauteur plus faible que les spectres d'émission ou d'excitation, ce qui favorise la séparation des sources lors de mélanges spectraux.

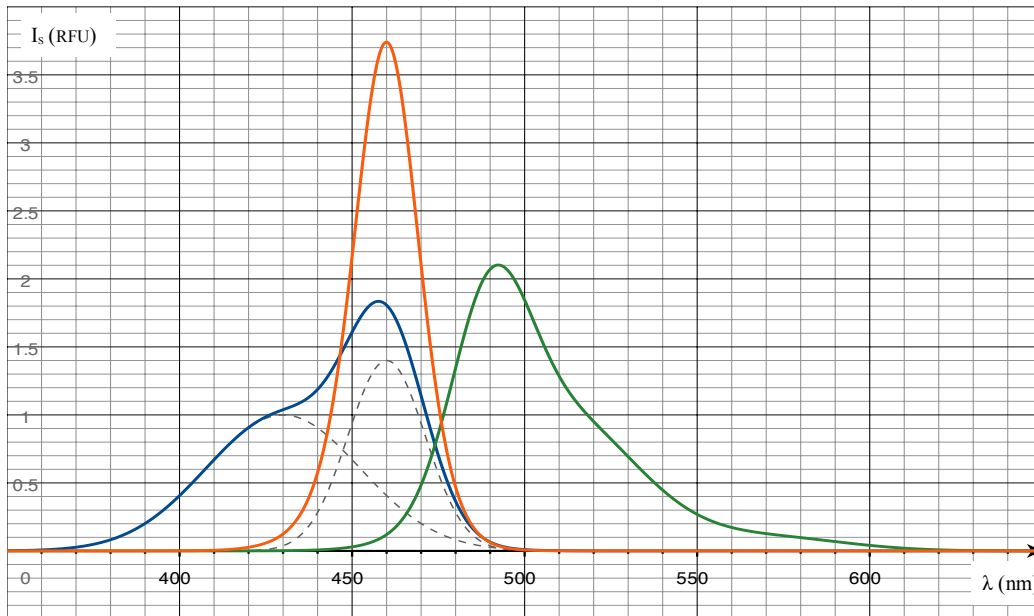


Figure 25 : Simulation de spectres synchrones obtenus avec des protéines fluorescentes. Le spectre d'excitation en bleu et le spectre d'émission en vert sont décrits par une somme de 2 fonctions gaussiennes. Leurs optimums sont séparés de 35 nm. La courbe rouge désigne le spectre synchrone à $\Delta\lambda = 30\text{nm}$, obtenu en appliquant l'équation 12.

Le piqué du signal synchrone est optimal si le décalage $\Delta\lambda$ sélectionné coïncide avec le plus petit des shifts de Stokes du fluorochrome étudié (Figure 26). En augmentant le décalage, l'unimodalité du spectre synchrone disparaît progressivement et la largeur à mi-hauteur augmente.

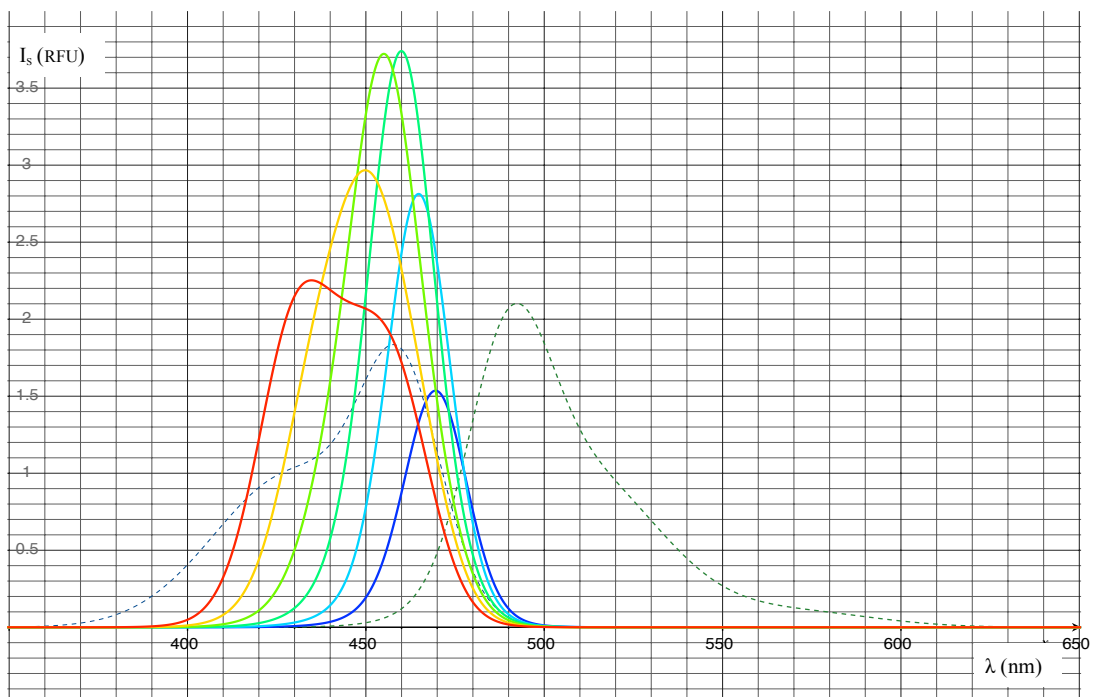


Figure 26 : Effet du décalage $\Delta\lambda$ choisi sur l'allure du spectre synchrone en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Les spectres synchrones sont calculés pour un $\Delta\lambda$ croissant allant de 10 à 60 nm avec un pas de 10 nm. Les courbes correspondantes sont coloriées du bleu (10 nm) au rouge (60 nm). Les spectres d'émission et d'excitation correspondant sont tracés en pointillé.

Ainsi, il est possible d'optimiser la forme d'un spectre synchrone et de forcer son caractère unimodal en choisissant judicieusement la valeur du décalage $\Delta\lambda$ (Figure 26). La position du maximum et le piqué du spectre synchrone sont directement dépendants des caractéristiques intrinsèques des fluorophores utilisés et du décalage $\Delta\lambda$ choisi. Pour des mélanges de biosenseurs fluorescents, l'ajustement de ce paramètre permet d'optimiser l'émission et la séparation des différentes sources spectrales. Le balayage synchrone permet de sélectionner la (ou les) bande(s) d'intérêt, tout en diminuant les interférences avec d'autres bandes.

Enfin, le spectre synchrone ne privilégie pas la longueur d'onde d'émission λ ou la longueur d'excitation λ' . Un spectre synchrone peut être considéré à la fois comme un spectre d'excitation ou un spectre d'émission et l'intensité synchrone I_s peut aussi bien être exprimée en fonction de λ ou de λ' .

Un signal synchrone est donc un spectre d'excitation à longueur d'onde d'émission variable ou inversement.

En combinant des mesures par spectroscopie de fluorescence synchrone (SFS) et une analyse CP, on obtient une méthode d'analyse multidimensionnelle assez efficace et robuste pour l'étude de mélanges de biosenseurs et de leurs interactions avec leur environnement. Grâce aux spectres synchrones, l'identification rapide et robuste par les méthodes d'analyse polyadique (CP) de systèmes basés sur des biosenseurs multicolores (intégrés au sein d'une même cellule) ou des mélanges de biosenseurs unicolores (hypothèse d'additivité) est désormais possible. Les caractéristiques et le principe d'application du couplage SFS/CP sont présentés dans les paragraphes suivants.

4. Estimation de la réponse de biosenseurs par le couplage Fluorescence/CP

L'analyse multimodale a été utilisée dans de nombreux domaines, principalement en calibration, en contrôle qualité et en analyse environnementale (Bro, 2006). Pour citer quelques exemples intéressants, elle intervient dans le monitoring des eaux potables en prenant en compte simultanément des paramètres chimiques [oxygène et nitrate dissous], physiques [température, turbidité,...] et biologiques [spécificité des bactéries fécales] (Barbieri et al. 2002), dans l'agroalimentaire (e.g. prédiction de la qualité texturale de différentes espèces de pommes de terres après cuisson ; Povlsen et al. 2003), en classification (e.g. distinction de différentes classes de phytoplanctons à partir de leur spectre de fluorescence ; Zhang et al. 2006) ainsi qu'en métabolomique (e.g. caractérisation de lipoprotéines ; Dyrby et al. 2005). Dans de plus rares cas, l'analyse multimodale a été utilisée en biologie des systèmes pour l'identification des variations d'expression géniques et protéiques (différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines) ou encore au travers de l'analyse intégrative de base de données en génomique fonctionnel regroupant simultanément les différents niveaux d'analyses « omiques » (Conesa et al. 2010 ; Yener et al. 2008).

Parmi ces domaines d'applications, certaines études relèvent d'un couplage CP/MEEF ou SFS. La plus grande majorité concerne l'analyse environnementale (e.g. interaction entre métaux traces et matière organique dissoute dans l'eau ; Yamashita et Jaffé, 2008) ou le contrôle qualité dans l'agroalimentaire (e.g. impact du temps de cuisson sur l'état de la viande bovine, Sahar et al. 2009). Mais étonnement, ce type de couplage n'a jamais été appliqué à l'analyse de la réponse de biosenseurs à cellules entières fluorescents. Face aux propriétés remarquables de la spectroscopie synchrone, seul le couplage SFS/CP a été envisagé et étudié dans ce travail.

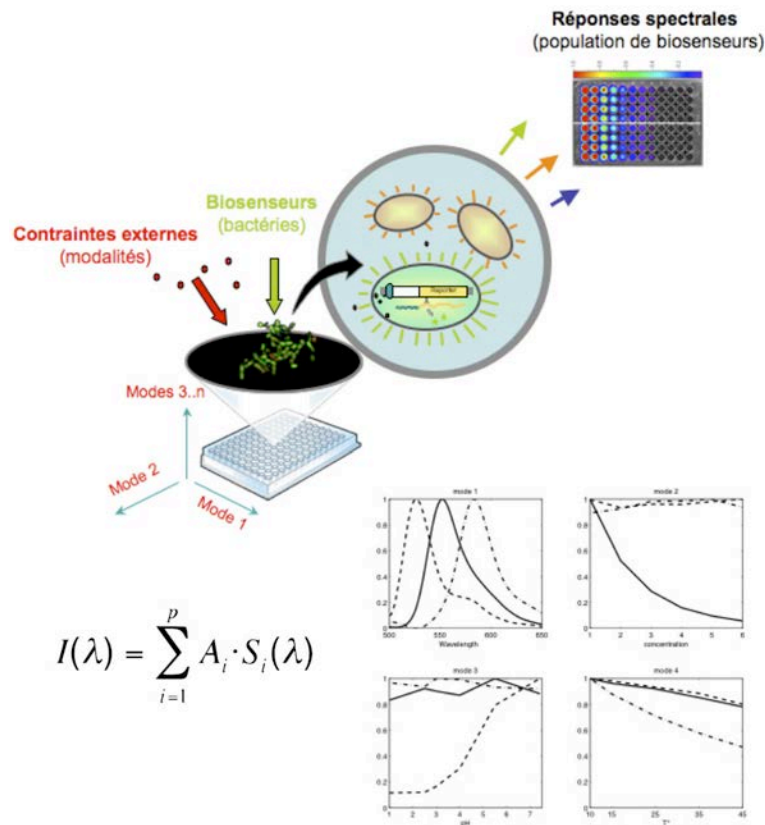


Figure 27 : Représentation schématique de la méthode - Couplage entre les plans d'expériences, la spectroscopie synchrones et la décomposition

4.1. Résumé des articles présentés

A partir de 4 souches *E. coli* TOP10 exprimant respectivement la GFP, turboYFP, E₂Orange et DsRed-express2 de manière constitutive, une série d'expérience a été réalisée afin de tester les capacités du couplage SFS/CP pour l'estimation de la réponse de biosenseurs fluorescents. La méthode permettant la production de données trilineaires à partir de microplaques 96 puits est décrite.

Les quatre souches ont ainsi été mélangées selon différents schémas permettant de (i) valider la capacité de séparation de signaux multiples et chevauchants, (ii) caractériser les modèles proposés par la méthode correspondant à des situations biologiquement envisageables : comportement de la méthode face aux dépendances inter et intra-mode, (iii) caractériser la limite de séparabilité de la méthode et son seuil de sensibilité et (iv) proposer une méthode permettant d'estimer le nombre de sources optimal avec lequel effectuer la décomposition CP.

Une série d'expériences a été réalisée pour tester la réponse de deux gènes de *P. aeruginosa* intervenant de façon antagoniste dans l'homéostasie du fer, exprimés en condition de carence (*pvdA*) ou d'excès (*bfrB*) de fer. Ces expériences ont permis de mettre en évidence la capacité du modèle Candecomp/Parafac à séparer deux rapporteurs fluorescents assez proches eYFP vs. GFP, quelles que soient les constructions "promoteur::rapporteur" employées ou les mélanges envisagés.

Parmi les résultats significatifs obtenus dans ce travail figurent la levée de plusieurs verrous importants limitant actuellement l'usage des biosenseurs en condition naturelle : (i) amélioration de la sensibilité des biosenseurs aux faibles et fortes concentrations, (ii) robustesse des courbes de réponses et (iii) élimination des effets de matrice (e.g. auto-fluorescence naturelle des cellules bactériennes ou du milieu extra-cellulaires) via la séparation des signaux parasites des signaux d'intérêt.

Bibliographie

- Acar, E., & Yener, B. (2009). Unsupervised multiway data analysis: A literature survey. *Knowledge and Data Engineering, IEEE Transactions on*, 21(1), 6-20.
- Ando, R., Mizuno, H., & Miyawaki, A. (2004). Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, 306(5700), 1370-1373.
- Barbieri, P., Adami, G., Piselli, S., Gemiti, F., & Reisenhofer, E. (2002). A three-way principal factor analysis for assessing the time variability of freshwaters related to a municipal water supply. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 62(1), 89-100.
- Bro, R., Workman JR, J. J., Mobley, P. R., & Kowalski, B. R. (1997). Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95, Part 3—Multi-way analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 32(3), 237-261.
- Bro, R. (2006). Review on multiway analysis in chemistry—2000–2005. *Critical reviews in analytical chemistry*, 36(3-4), 279-293.
- Caland, F. (2013). Décomposition tensorielle de signaux luminescents émis par des biosenseurs bactériens pour l'identification de Systèmes Métaux-Bactéries – Thèse, Université de Lorraine).
- Cattell, R. B. (1944). "Parallel proportional profiles" and other principles for determining the choice of factors by rotation. *Psychometrika*, 9(4), 267-283.
- Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*, 90(3), 1103-1163.
- Conesa, A., Prats-Montalbán, J. M., Tarazona, S., Nueda, M. J., & Ferrer, A. (2010). A multiway approach to data integration in systems biology based on Tucker3 and N-PLS. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 104(1), 101-111.
- Day, R. N., & Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2887-2921.
- Dinh, T. V. (1978). Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, 50(3), 396-401.
- Dyrby, M., Petersen, M., Whittaker, A. K., Lambert, L., Norgaard, L., Bro, R., & Engelsen, S. B. (2005). Analysis of lipoproteins using 2D diffusion-edited NMR spectroscopy and multi-way chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 531(2), 209-216.
- Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P. E., Stock, J. B., & Leibler, S. (1999). Protein Mobility in the Cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181(1), 197-203.
- Harshman, R. A. (1970). Foundations of the parafac procedure: models and conditions for an " explanatory" multimodal factor analysis.
- Jiji, R. D., Cooper, G. A., & Booksh, K. S. (1999). Excitation-emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*, 397(1), 61-72.
- Kolda, T. G., & Bader, B. W. (2009). Tensor decompositions and applications. *SIAM review*, 51(3), 455-500.

- Kruskal, J. B. (1977). Three-way arrays: rank and uniqueness of trilinear decompositions, with application to arithmetic complexity and statistics. *Linear algebra and its applications*, 18(2), 95-138.
- Kruskal, J. B. (1989). Rank, decomposition, and uniqueness for 3-way and N-way arrays. *Multiway data analysis*, 33.
- Lippincott-Schwartz, J., & Patterson, G. H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616), 87-91.
- Lloyd, J. B. F. (1971). Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature*, 231(20), 64-65.
- Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S., & Verkhusha, V. V. (2005). Photoactivatable fluorescent proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 885-890.
- Marose, S., Lindemann, C., & Scheper, T. (1998). Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring. *Biotechnology Progress*, 14(1), 63-74.
- Patra, D., Lakshmi Sireesha, K., & Mishra, A. K. (2001). Characterization and investigation of polycyclic aromatic compounds present in petrol, diesel, kerosene and 2T oil using excitation emission matrix fluorescence. *Indian Journal of Chemistry Section A*, 40(4), 374-379.
- Patra, D. (2003). Applications and new developments in fluorescence spectroscopic techniques for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Povlsen, V. T., Rinnan, Å., Van den Berg, F., Andersen, H. J., & Thybo, A. K. (2003). Direct decomposition of NMR relaxation profiles and prediction of sensory attributes of potato samples. *LWT-Food Science and Technology*, 36(4), 423-432.
- Sahar, A., Boubellouta, T., Portanguen, S., Kondjoyan, A., & Dufour, É. (2009). Synchronous Front-Face Fluorescence Spectroscopy Coupled with Parallel Factors (PARAFAC) Analysis to Study the Effects of Cooking Time on Meat. *Journal of food science*, 74(9), E534-E539.
- Shav-Tal, Y., Darzacq, X., Shenoy, S. M., Fusco, D., Janicki, S. M., Spector, D. L., & Singer, R. H. (2004). Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, 304(5678), 1797-1800.
- Sidiropoulos, N. D., & Bro, R. (2000). On the uniqueness of multilinear decomposition of N-way arrays. *Journal of chemometrics*, 14(3), 229-239.
- Smilde, A., Bro, R., & Geladi, P. (2005). *Multi-way analysis: applications in the chemical sciences*. John Wiley & Sons.
- Teixeira, A. P., Portugal, C. A., Carinhas, N., Dias, J. M., Crespo, J. P., Alves, P. M., & Oliveira, R. (2009). *In situ* 2D fluorometry and chemometric monitoring of mammalian cell cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 102(4), 1098-1106.
- Ten Berge, J. M. (2000). The typical rank of tall three-way arrays. *Psychometrika*, 65(4), 525-532.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 509-544.
- Tulu, U. S., Rusan, N. M., & Wadsworth, P. (2003). Peripheral, non-centrosome-associated microtubules contribute to spindle formation in centrosome-containing cells. *Current biology*, 13(21), 1894-1899.
- Verkhusha, V. V., & Lukyanov, K. A. (2004). The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature biotechnology*, 22(3), 289-296.

Approche multilinéaire pour l'estimation de la réponse de biosenseurs fluorescents

- Yamashita, Y., & Jaffé, R. (2008). Characterizing the interactions between trace metals and dissolved organic matter using excitation–emission matrix and parallel factor analysis. *Environmental science & technology*, 42(19), 7374-7379.
- Yener, B., Acar, E., Aguis, P., Bennett, K., Vandenberg, S. L., & Plopper, G. E. (2008). Multiway modeling and analysis in stem cell systems biology. *BMC systems biology*, 2(1), 63.
- Zhang, Q. Q., Lei, S. H., Wang, X. L., Wang, L., & Zhu, C. J. (2006). Discrimination of phytoplankton classes using characteristic spectra of 3D fluorescence spectra. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(2), 361-369.

Multi-way signal processing for multicolor fluorescent biosensing.

Parrello Damien, Billard Patrick, Zegeye Asfaw, David Brie, Sebastian Miron and Mustin Christian

Publié : In Advances in Systems and Synthetic Biology, Proceedings, March 24-28th 2014, P. Amar, F. Képès and Vic Norris Eds. , pp91-105

Résumé

In this paper, we investigate the possibility of modelling the concomitant response of multiple bacterial genes to environmental factors by using fluorescent whole cell biosensors. An experimental procedure is proposed to obtain three-way data sets by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS). A Candecom/Parafac algorithm (CP) is then proposed to separate simultaneously all the fluorescence signals of reporter proteins and to interpret the response of the corresponding promoters. The joined estimation of several gene responses is the main original point of this blind identification procedure. The method proves to be more powerful than the traditional principal components analysis (PCA) or the singular value decomposition (SVD) and provides a promising multi-way strategy for in vivo monitoring of gene expression in system biology studies.

Multi-way signal processing for multicolor fluorescent biosensing.

Parrello Damien^{*†}, Billard Patrick[†], Zegeye Asfaw[†], David Brie[†], Sebastian Miron [†] and Mustin Christian[†]

Corresponding Author: damien.parrello@univ-lorraine.fr

[†] **Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)**
UMR 7360 CNRS - Université de Lorraine, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY
[†] **Laboratoire en Automatique de Nancy (CRAN)**
UMR 7039 CNRS - Université de Lorraine, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

Abstract

In this paper, we investigate the possibility of modelling the concomitant response of multiple bacterial genes to environmental factors by using fluorescent whole cell biosensors. An experimental procedure is proposed to obtain three-way data sets by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS). A Candecomp/Parafac algorithm (CP) is then proposed to separate simultaneously all the fluorescence signals of reporter proteins and to interpret the response of the corresponding promoters. The joined estimation of several gene responses is the main original point of this blind identification procedure. The method proves to be more powerful than the traditional principal components analysis (PCA) or the singular value decomposition (SVD) and provides a promising multi-way strategy for in vivo monitoring of gene expression in system biology studies.

Introduction

One of the essential aspects to understand cellular systems is to identify the topology of gene regulatory networks from which the metabolic networks are organized and which reflect the functional and adaptive response of the system to its environment [1,2]. A popular method consists of coupling a reporter gene encoding a fluorescent protein with an environmentally responsive promoter [3]. A single wavelength measurement is then realized to detect and quantify the resulting fluorescence. However, monitoring simultaneously the expression of several genes using fluorescent reporters becomes increasingly challenging due to possible overlaps of their excitation/emission spectra. It is therefore necessary to choose compatible, spectrally distant reporter proteins to avoid fluorescence crosstalk. Consequently, only a limited number of reporters can be used despite the wide range of fluorescent proteins currently available. Moreover autofluorescence of culture media and bacteria cells may hamper the use of fluorescent reporters for *in vivo* or *in situ* approaches.

Traditional data analysis approaches just allow to study a system by analyzing its parts in pairs. For instance, data from a gene expression experiment will be organized in matrices such as *gene 1 x analyte 1*, *gene 2 x analyte 1*, *gene 1 x condition 2*, etc. Some properties of the system can depend on these two-way interactions but all properties depending on higher order interactions cannot be revealed and understood. Several studies show the limit of two-way models to detect the underlying structures in multi-way arrays, *i.e* in complex systems [4,5]. The development of multi-way models was performed through the generalization of the standard two-way methods to higher order datasets. With increasing number of application areas, multi-way data analysis has become popular as an exploratory analysis tool but its potential is still largely unexploited in biology [6]. One of the most well-known and commonly applied multi-way models in literature is the Candecomp/Parafac (CP) model, a powerful multi-way data analysis which can also be used as a blind sources separation technique [7].

This paper proposes an original approach able to produce three-way models from CP decomposition of synchronous fluorescence spectra datasets. Models describe the dynamic expression of a set of genes of interest as the function of two crossed environmental parameters. Coupling synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) and CP decomposition allows extending the potential of fluorescent

whole-cell biosensors to the study of the relationship between several genes in a systemic and non-destructive fashion.

Materials and Methods

Bacterial strains

E. coli TOP10 strain was engineered to constitutively produce fluorescent proteins. Plasmid pPROBE-NT' [8] served as a backbone for the construction of a new promoter probe plasmid series where the *gfp* gene was switched by three others reporter genes encoding turboYFP, E2orange, and dsRed express2. The expression of each reporter gene is controlled by the *lac* promoter (not shown). These new plasmids were introduced in *E. coli* TOP10 by transformation to yield four fluorescent bioreporters strains:

- [gfp], i.e. *E. coli* TOP10- pPROBE-NT'lac constitutively producing green fluorescent protein GFP
- [yfp] *E. coli* TOP10-pPRlacY538 constitutively producing the green-yellow fluorescent protein turboYFP
- [E2or] *E. coli* TOP10 -pPRlacO561 constitutively producing the orange fluorescent protein E2orange
- [dsRx] *E. coli* TOP10-pPRlacX591 constitutively producing the red fluorescent protein dsRed express2.

These whole cell bioreporters covered a large domain of fluorescence ranging from blue-green (490 nm) to orange (over 560 nm) and from green (510 nm) to red (590 nm) in excitation and in emission respectively. On the contrary, the untransformed TOP10 strain displayed a very low basal fluorescence.

Culture conditions

E. coli TOP10 strains were cultured at 37°C overnight in Lysogeny broth (LB, Sigma, pH 7) supplemented with kanamycin (30 mg.L⁻¹) at 260 rpm. Before dispensing and patterning in microplate, fluorescent cell suspensions were rinsed twice in a saline solution (NaCl 9‰) and their optical density (OD_{600nm}) was adjusted to 2 (≈ 4.10⁸ cells.ml⁻¹)

Cells suspensions were finally dispensed in black polypropylene 96-well microplates (Eppendorf Microplate 96/U) with an automated pipetting system (Eppendorf epMotion 5070) according to the pattern described below.

Microplate Patterning and Three-way dataset generation

We simulated the response of 4 genes following two arbitrary parameters by mixing several serial dilutions of cell suspensions of bioreporters in a black 96-well microplate according to the experimental matrix presented in figure 1. This special patterning generates a three way dataset useable by signal processing method (CP). In a “real” experiment, the dispensing pattern must constraint experimental diversity, e.g. by varying gradually or randomly specific environmental factors, in order to identify and estimate the transcriptional response of the studied genes. It is quite similar to iterative refinement, a multi-way data production strategy used in systems biology.

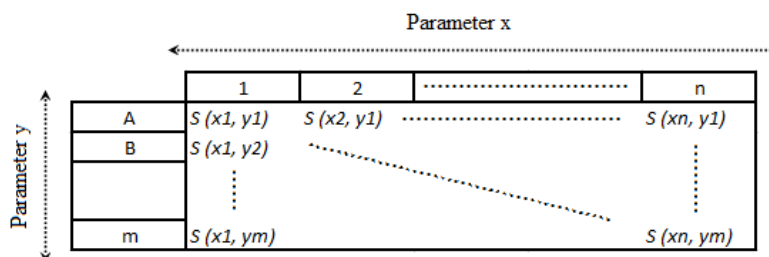


Figure 1: Generalized experimental matrix to produce three-way dataset for CP decomposition. *S* (x,y) represents spectra following the variation of parameters x and y.

Three-way experimental patterns (A, B and C) were developed to study the characteristics of CP separation profiles of known sources corresponding to general gene expressions patterns. Experimental Pattern A was developed to test CP decomposition efficiency on a trilinear dataset of four overlapping fluorescent signals, evolving independently. In addition, patterns B and C were designed to study the CP decomposition according to colinear or partial colinear response of reporter genes to the parameters of interest. For pattern B, TOP10- pPRlac-Y538 [yfp] and TOP10-pPRlac-O561 [E2or] strains were mixed to produce a trilinear dataset presenting a colinearity in one mode. For pattern C, the same bioreporters [yfp] and [E2or] were mixed to design a trilinear dataset presenting a partial colinearity in mode 1 and independent behavior on mode 2 but similar to one in mode 1.

In details, to generate the pattern A, [gfp] and [E2or] suspensions were diluted six times in a 2ml Eppendorf deepwell plate according to a dilution factor of 2/5 and [yfp] and [dsRx] suspensions according to a dilution factor of 1/3. The genuine TOP10 strain was used as a diluent to maintain a constant cell concentration in the wells. Cell suspensions were then distributed in the microplate as described in figure 2. From column 1 to column 7 and from line A to line E, the density of fluorescents reporters (gfp, yfp, E2or and dsRx) varied whereas the total cell density remain constant ($OD_{600nm}=2$). Thus, the contributions of GFP, turbo-YFP, E2orange and dsRed express2 fluorescence signal decreased or increased as a function of the dilution rank (parameter x) or of the mixing ratios (parameter y).

	1	2	7
A	yfp7 (80ul) / dsRx1 (20ul) E2or1 (100 ul) / GFP7 (0 ul)	yfp6 (80ul) / dsRx2 (20ul) E2or2 (100 ul) / GFP6 (0 ul)		yfp1 (80ul) / dsRx7 (20ul) E2or7 (100 ul) / GFP1 (0 ul)
B	yfp7 (65ul) / dsRx1 (35ul) E2or1 (100 ul) / GFP7 (0 ul)	.	.	.
C	yfp7 (50ul) / dsRx1 (50ul) E2or1 (100 ul) / GFP7 (0 ul)	.	.	.
D	yfp7 (35ul) / dsRx1 (65ul) E2or1 (0 ul) / GFP7 (100 ul)	.	.	.
E	yfp7 (20ul) / dsRx1 (80ul) E2or1 (0 ul) / GFP7 (100 ul)	.	.	.

Figure 2: Microplate dispensing pattern (A) to simulate biosensors expression following two arbitrary parameters. Numbers 1 to 7 represent the rank of dilution of *E.coli* TOP10 bioreporters (GFP, turbo-YFP, E2Orange and dsRed Express2). Dispensed volume of each bioreporters (microliters) is given in parenthesis.

Similar experiments were performed with each bioreporters mixed with three aliquots of non-transformed *E.coli* TOP10 strain, to estimate the independent response of fluorescent bioreporters in order to obtain references of CP decompositions. They will serve to discuss CP results.

The pattern B and C were designed in the same way to study the CP decomposition according to colinearity and partial colinearity behaviors on a same parameter or between two parameters.

Fluorescence spectra acquisition

Before fluorescence reading, cell suspensions (36 wells) were shortly mixed with vortex mixer (Mixplate Eppendorf). Synchronous Fluorescence Spectra (SFS) were performed in 96 well microplate with two-grating monochromator spectrofluorometer *FLX-Xenius®* (SAFAS, Monaco), equipped with a 150 W Xenon lamp as excitation source. The Synchronous Fluorescence Spectra (SFS) analysis of biosensors suspensions was measured in the excitation wavelength range of 400–700 nm at constant offset $\Delta\lambda$ of 20 nm. Spectra were recorded with a spectral step of 2 nm, a mean scan speed of 600 nm.min⁻¹. The excitation and emission slits width were 10 nm and the photodiode detector was operating at a voltage of 750 V. Raw fluorescence data (without filtering or smoothing) were collected and exported for further signal processing with CP algorithms running under Matlab software.

Figure 3 summarizes characteristics of GFP, turbo-YFP, E₂orange and dsRed express2 SFS spectra expressed in TOP10strains according to the spectral acquisition described above.

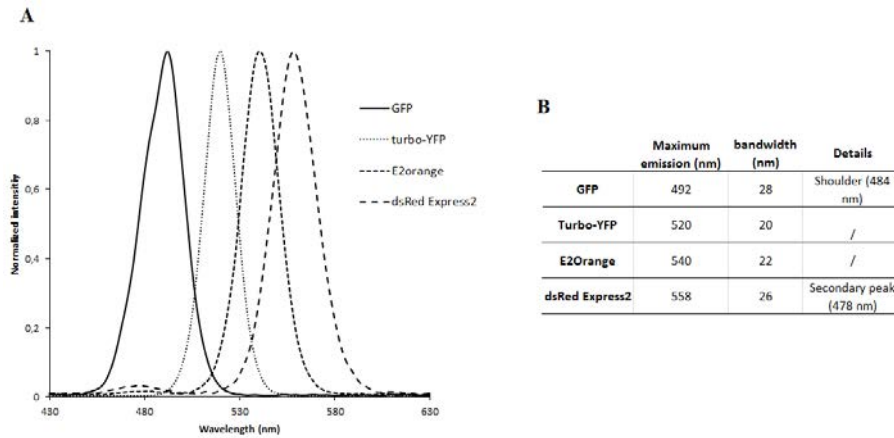


Figure 3: Normalized SFS spectra of GFP, turbo-YFP, E₂Orange and dsRed Express2 (A) and their spectral characteristics (B). Wavelength shift $\Delta\lambda = 20$ nm.

Candecomp/Parafac (CP) decomposition

The estimation of CP decomposition of the three way SFS data is achieved by an optimized non-negative ALS algorithm. The code was developed by Bro and Anderson and is available in the Matlab N-way toolbox [9]. The R order CP decomposition of a three-way array **X** (three-order tensor) can be written as:

$$X = \sum_{i=1}^R a_i b_i c_i + E$$

, where R is the number of factors (i.e. the number of fluorescence sources) **a_i**, **b_i** and **c_i** the three component matrices and **E** a residual three-order tensor representing signal noise or behaviour that could not be included in the decomposition model. CP method approximates the three-way datasets as the sum of the tri-linear behavior of each identified factor.

With SFS data set presented herein, performing the CP decomposition yields the three factors representing both the spectra of each bioreporters and their responses to the cross parameters (x,y) (Figure 4).

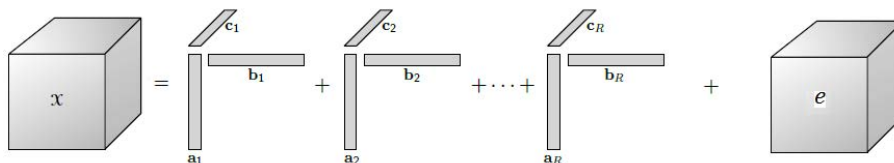


Figure 4: CP decomposition of a three-order tensor χ composed of R fluorescent sources ; Vectors a_i , b_i , c_i given respectively an estimation of the SFS and of responses versus the two modes, i.e. corresponding to parameters x,y.

Results and Discussion

Benefits of coupling synchronous fluorescence spectroscopy with CP decomposition

We combined the synchronous fluorescence spectroscopy with the CP decomposition in order to simultaneously analyze the expression of multiple genes in multi-parametric experiments.

On the one hand, SFS facilitates the data acquisition and improves the quality of the spectral information. The commonly used technique to collect the entire fluorescent signals is to perform an excitation-emission matrix. However this procedure is time consuming and bleaches fluorescent signals. Another alternative is to vary simultaneously (in a synchronous manner) the excitation (λ_{ex}) and emission (λ_{em}) wavelength while keeping a constant interval $\Delta\lambda$ between them. This procedure was proposed by Lloyd (1971) and leads to numerous advantages compared to classical fluorescent spectroscopies as demonstrated by Tuan Vo-Dinh (1978) [10,11]. SFS records the diversity of fluorescent signals (e.g. mix of biosensors) in a single multimodal spectrum, improves the sensibility and the spectral resolution, simplifies spectra, reduces interference signals, and gives the ability to select spectral information. This last property is particularly powerful when several genes are tagged or when biosensors are used simultaneously. Indeed the wavelength shift ($\Delta\lambda = \lambda_{emission} - \lambda_{excitation}$), can be tuned in order to amplify signals of interest (e.g. close) or to limit interference signals [11,12]. A suitable approach consists to set this value close to Stoke's shift of fluorescence proteins.

On the other hand, CP decomposition solves the fluorescence overlapping issue without *a priori* about the source signals and reveals if any, the multi-linear relationship between spectral components [7,13,14,15]. Generally, interferences and overlaps between emission bands (spontaneous fluorescence from metabolites or medium) limit the interpretation of fluorescence data. Thus, the simultaneous monitoring of gene expressions remains complicated and lead to work with limited set of fluorescent proteins or reporters. The identification of spectral sources is a classical but difficult problem in signal processing, needing blind and powerful identification procedure. Traditional data analysis methods such as Partial Least Square projection (PLS) or Single Value Decomposition (SVD) require an extended knowledge of source spectra (Database) or are limited to bi-linear approaches. Two-way analysis methods do not take into account more than two parameters at the same time without disrupting the inner structures of datasets [16,17]. Moreover, the two-way identification procedures of unknown sources assume that the spectra are independent (orthogonal). These methods applied to a non-negative SFS data set would likely yield negative values in estimated spectra. Nevertheless, statistical approaches are especially useful for generating single dimensional solutions for multidimensional biological data.

Performing the CP decomposition yields the three factors representing respectively the fluorescence spectra of each bioreporters and their responses to the studied environmental parameters. Multi-way CP decomposition is, thus, a promising tool to study complex systems such as microorganisms interacting with their surrounding and is able to integrate multiple variables in a criss-cross fashion.

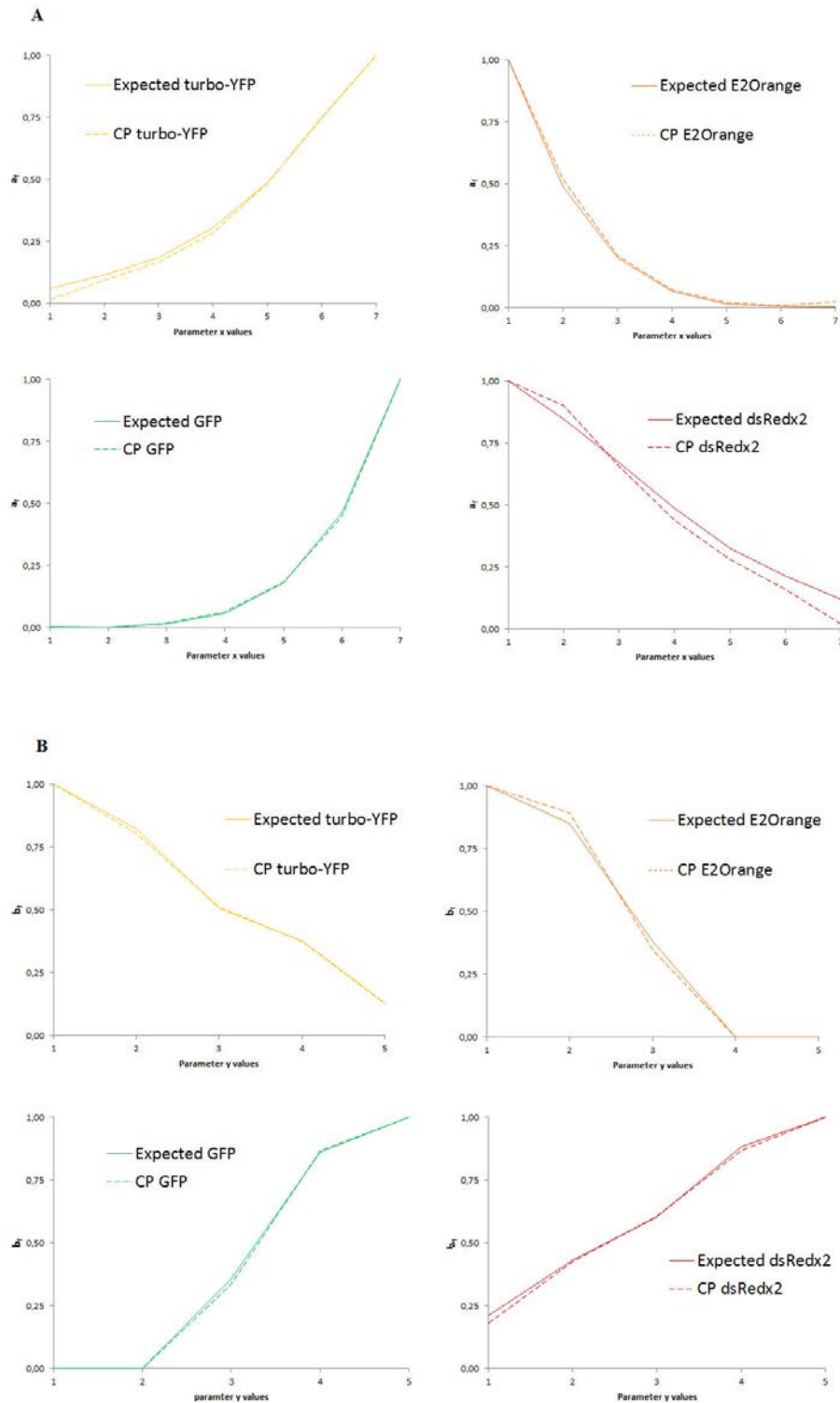
CP decomposition of SFS datasets

CP decomposition is sensitive to the behavior of the identified sources. Characterizing the separation profiles of known sources corresponding to general cases (independence, colinearity, partial colinearity behaviors) is essential to correctly interpret gene relationships in real studies.

The results of CP decomposition on three experimental three-way datasets (A, B and C) are presented hereafter. They are compared to the expected behaviour of gene response (set by dispensing pattern) and to reference spectra of the fluorescent proteins (Figure 3).

Figure 5 displays the results of the CP decomposition with 4 sources corresponding to the experimental pattern A (presented in Figure 2). Taking into consideration pipetting variations, source behaviours estimated by CP decomposition are in concordance with the expected variations of fluorescence *versus* parameters x and y (Figures 5A & B, Mode 1 and 2 respectively). Moreover, the spectral identification of the 4 bioreporters (gfp, yfp, E2or and dsRx) is faithful with the recorded

references (Figure 5C). Peak positions and half-bandwidths of estimated spectra are accurate and spectral overlaps between fluorescent reporter proteins are not an issue. For example, in spite of their narrow emission peaks (18 nm), spectra of E2orange and dsRed express2 may still separate.



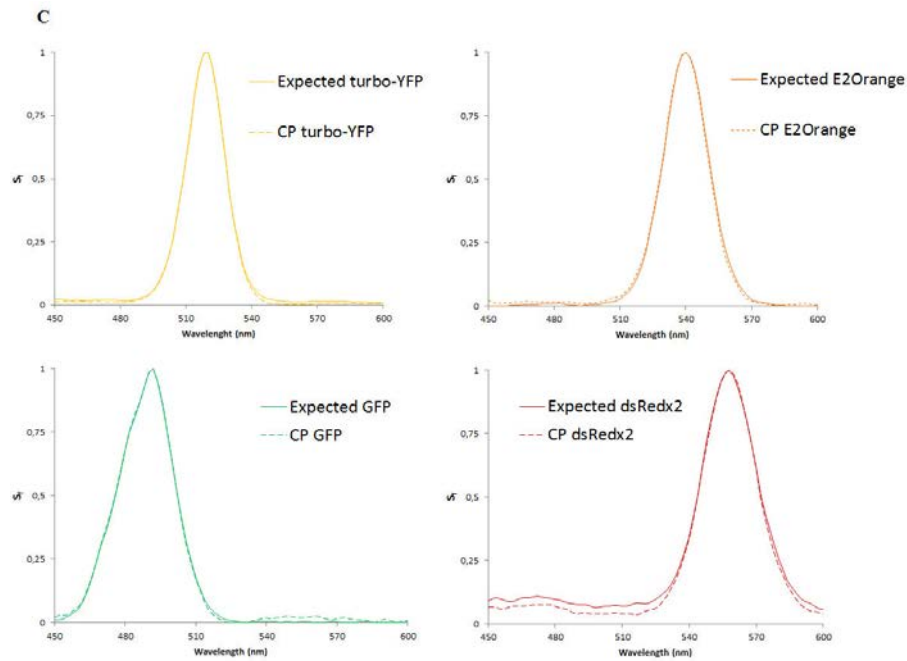


Figure 5: Concordance of CP decomposition results (dotted lines) with expected ones (solid lines) for pattern A. Mode 1 (parameter x) and Mode 2 (parameter y) are presented in box A and B. Box C showed the identified sources spectra (SFS).

Figure 6 shows the results of the CP decomposition with 2 sources corresponding to the experimental pattern B, designed to study the effect of co-linearity on one mode. The decomposition identified without any error the co-linearity on the first mode, but the estimated spectra do not perfectly match the references. Slight shoulders appear symmetrically on the right side of turbo-YFP spectra and on the left side of E2orange spectra. In details, the decomposition is incomplete and CP algorithm attributed randomly a part of the turbo-YFP signal to E2orange signal and vice versa. As a consequence, if two or more responses of genes are co-linear in one mode, their spectra will be supplemented by secondary bands corresponding to the collinear sources. Particularly in the case of full co-linearity, only one spectrum including an amalgam of the sources will be identified.

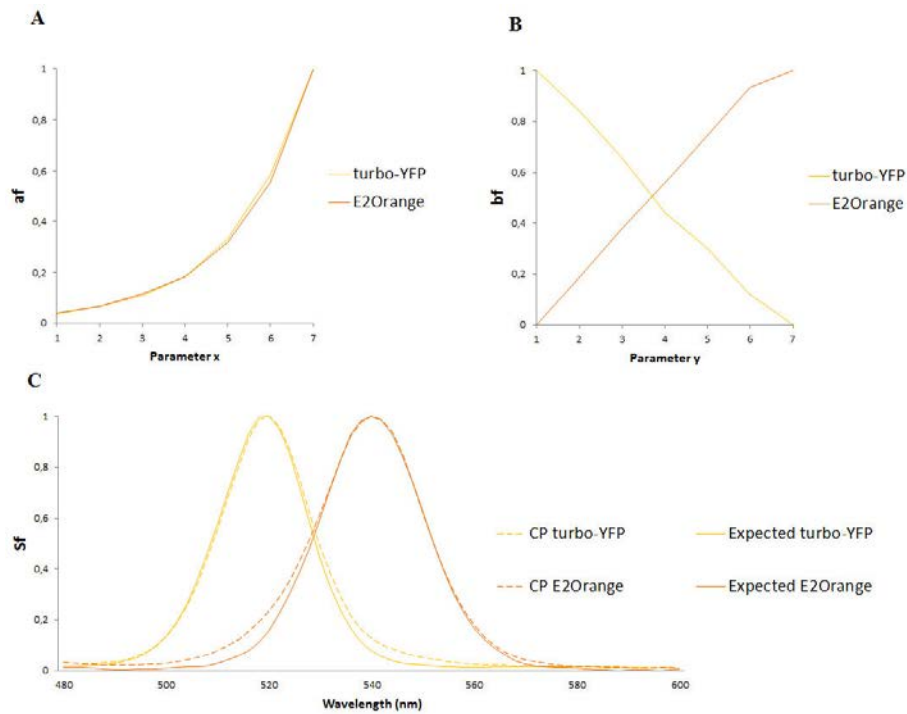


Figure 6: Concordance of CP decomposition for pattern B. Mode 1 (parameter x) and Mode 2 (parameter y) are presented in box A and B. Box C showed the identified sources spectra (SFS) in dotted lines and expected ones in solid lines.

Figure 7 illustrates the results of the CP decomposition with 2 sources corresponding to the experimental pattern C, designed to study the effect of partial co-linearity on one mode with inter-modal co-linearity. In this case, the CP decomposition identified correctly the two fluorescent sources and their respective behaviours vs. mode 1 and 2. The partial co-linearity is fixed by 4 points (out of 7).

Supplementary experiments demonstrated that (i) only one varying point can be necessary to properly separate two collinear sources and (ii) even if their maximum of emission are separated by 5 nm (data not shown).

As shown by the results, coupling synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) and CP decomposition allows extending the potential use of fluorescent whole cell biosensors to the study of the relationship between genes in a systemic fashion. And if the maturation time of fluorescent proteins is taken into account, then a temporal dimension can be integrated in the experiments without disturbing the system integrity.

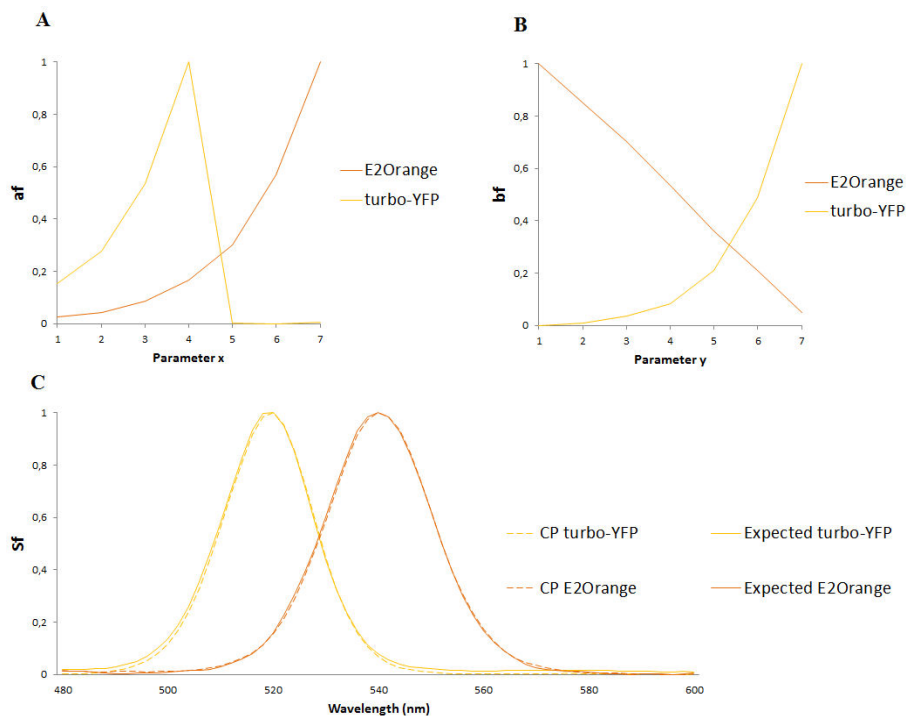


Figure 7: Concordance of CP decomposition for pattern C. Mode 1 (parameter x) and Mode 2 (parameter y) are presented in box A and B. Box C showed the identified sources spectra (SFS) in dotted lines and expected ones in solid lines.

Limits of the method: rank of decomposition

A well-known problem when using CP decomposition is the choice of the number of the components or sources with which the decomposition has to be done. In others words, how many relevant signal sources contribute to explain the variation of the data according to the different modes? The decomposition can be performed with infinity of sources but one cannot ensure that the supplementary sources fit either relevant behaviors or the noise.

However it is possible to estimate an optimal number of sources according to the energy component of each source. The energy component represents the level of contribution of each source in the explained variation. The explained variation indicates the fitting accuracy of the initial data tensor. For instance, an explained variance of 90% means that 90% of the variation in the data is described by the model, while the remaining 10% is related to the noise or data not included in the model. Thus we can soundly define that if the n^{th} supplementary source is 2 log under the most explicative source, the optimal number of sources is (n-1). Figure 8 shows the evolution of the energy component versus rank of decomposition. The energy component stays almost stable for 4 sources with less than 1 log of difference between them. This means that 4 sources are needed to correctly fit the data. The 5th source is more than 2 log lower and thus not required to significantly improve the model.

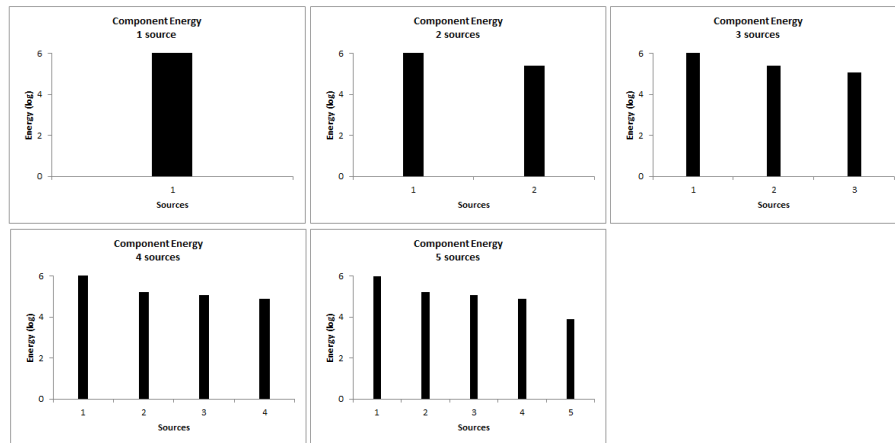


Figure 8: Component Energy for CP decomposition of dataset A achieved with 1 to 5 sources. Energy is expressed in logarithm.

Conclusion

We developed an original method at the interface of synthetic biology and systems biology in order to study topology of gene networks. From a natural set of genes representative of a cellular response, a linear synthetic circuit integrating the corresponding promoters coupled with reporter genes can be constructed and inserted into an organism of interest which can be used in multi-way experiments to capture genetic network topologies. Spectral data acquisition realized with synchronous fluorescent spectroscopy helps to facilitate the production of diversified multiway dataset. CP-based signal separation methods solve simultaneously the overlapping issue linked to complex environments (autofluorescent medium, metabolites, etc) and the use of neighbouring reporter signals. CP decomposition was chosen because of its signal separation potential but also because the models arising from it can be interpreted without ambiguity. The proposed methodology was used to study a three-way dataset that simulate different gene expression topologies. We demonstrated that the method could be used to study several overlapping signals and that the quality of the separation is linked to the interactions of these signals as a function of cross parameters (modes) from which the gene network dynamic can be described.

The proposed method cannot integrate as many genes as the classical transcriptomic approach but offer the opportunity to confirm the identified networks and monitor them temporally without perturbing the system. In an another work, we applied the method for the study of two antagonist genes involved in the iron homeostasis (bfrB and pvdA) present in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain (a model of soil bacterium) and described a sensibility threshold of this simple gene system to iron starvation which was not yet reported and thus confirmed the high potential of this methodology for the study of living systems.

This work has been supported by the French ANR program through grant ANR-09-BLAN-0336-04.

References

- [1] Aderem, A. (2005). Systems biology: its practice and challenges. *Cell*, 121(4), 511-513.
- [2] Kitano, H. (2002). Systems biology: a brief overview. *Science*, 295(5560), 1662-1664.
- [3] Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S., & Smith-Spencer, W. (2000). Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews*, 100(7), 2705-2738.
- [4] Estienne, F., Matthijs, N., Massart, D. L., Ricoux, P., & Leibovici, D. (2001). Multi-way modelling of high-dimensionality electroencephalographic data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(1), 59-72.
- [5] Acar, E., Camtepe, S. A., Krishnamoorthy, M. S., & Yener, B. (2005). Modeling and multiway analysis of chatroom tensors. In *Intelligence and Security Informatics* (pp. 256-268). Springer Berlin Heidelberg.

- [6] Yener, B., Acar, E., Aguis, P., Bennett, K., Vandenberg, S., & Plopper, G. (2008). Multiway modeling and analysis in stem cell systems biology. *BMC Systems Biology*, 2(1), 63.
- [7] Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 38(2), 149-171.
- [8] Miller, W. G., Leveau, J. H., & Lindow, S. E. (2000). Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), 1243-1250.
- [9] C. A. Andersson and R. Bro, "The N-way toolbox for MATLAB," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.52, pp. 1-4, 2000.
- [10] Lloyd, J. B. F. (1971). Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature*, 231(20), 64-65.
- [11] Dinh, T. V. (1978). Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, 50(3), 396-401.
- [12] Patra, D., & Mishra, A. K. (2002). Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(12), 787-798.
- [13] Harshman, R. A. (1970). Foundations of the PARAFAC procedure: models and conditions for an "explanatory" multimodal factor analysis.
- [14] Kroonenberg, P. M. (1992). Three-mode component models: A review of the literature. *Statistica*, 4, 619.
- [15] Harshman, R. A., & Lundy, M. E. (1994). PARAFAC: Parallel factor analysis. *Computational Statistics & Data Analysis*, 18(1), 39-72.
- [16] Acar, E., & Yener, B. (2009). Unsupervised multiway data analysis: A literature survey. *Knowledge and Data Engineering, IEEE Transactions on*, 21(1), 6-20.
- [17] Golub GH, Van Loan CF (1989). Matrix computations Baltimore: Johns HopkinsUniversity Press.

Multicolor Whole-Cell Bacterial Sensing Using a Synchronous Fluorescence Spectroscopy-Based Approach

Parrello Damien, Mustin Christian, David Brie, Sebastian Miron, Billard Patrick

Accepté : Plos-One (Février 2015)

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0122848 March 30, 2015

Résumé

The wide collection of currently available fluorescent proteins (FPs) offers new possibilities for multicolor reporter gene-based studies of bacterial functions. However, the simultaneous use of multiple FPs is often limited by the bleed-through of their emission spectra. Here we introduce an original approach for detection and separation of multiple overlapping fluorescent signals from mixtures of bioreporters strains. The proposed method relies on the coupling of synchronous fluorescent spectroscopy (SFS) with blind spectral decomposition achieved by the Canonical Polyadic (CP) decomposition (also known as Candecomp/Parafac) of three-dimensional data arrays. Due to the substantial narrowing of FP emission spectra and sensitive detection of multiple FPs in a one-step scan, SFS reduced spectral overlap and improved the selectivity of the CP unmixing procedure. When tested on mixtures of labeled E. coli strains, the SFS/CP approach could easily extract the contribution of at least four overlapping FPs. Furthermore, it allowed to simultaneously monitor the expression of three iron responsive genes and pyoverdine production in P. aeruginosa. Implemented in a convenient microplate format, this multiplex fluorescent reporter method provides a useful tool to study complex processes with different variables in bacterial systems.

Multicolor whole-cell bacterial sensing using a joint synchronous fluorescence spectroscopy - Candecomp/Parafac-based approach

Parrello Damien*⁺, Mustin Christian⁺ David Brie[†], Sebastian Miron [†] Billard Patrick⁺,

Address correspondence to Patrick Billard: patrick.billard@univ-lorraine.fr

⁺ **Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)**
UMR 7360 CNRS - Université de Lorraine, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY
[†] **Laboratoire en Automatique de Nancy (CRAN)**
UMR 7039 CNRS - Université de Lorraine, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

Running title: Multicolor fluorescent whole-cell biosensing

Abstract

The wide collection of currently available fluorescent proteins (FPs) offers new possibilities for multicolor reporter gene-based studies of bacterial functions. However, choosing the appropriate FPs for a given bacterial strain or application is not straightforward, and the simultaneous use of multiple FPs is often limited by the overlap of their emission spectra. Here we have constructed a series of promoter probe vectors utilizing 14 different FPs and tested their performance as fluorescent labels in Gram-negative bacteria. This was achieved by comparing the toxicity of FPs in *E. coli* and in vivo brightness when expressed from a P_{lac} promoter in *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* and *Shewanella oneidensis*. In addition, we developed an original approach for efficient detection and separation of multiple overlapping fluorescent signals from mixtures of bioreporters strains. Such an approach relies on the coupling of synchronous fluorescent spectroscopy (SFS) with blind spectral decomposition achieved by the Canonical Polyadic (CP) decomposition (also known as Candecomp/Parafac) of three-dimensional data arrays. Due to the substantial narrowing of FP spectra and sensitive detection of multiple FPs in a one-step scan, SFS reduced spectral overlap and improved the selectivity of the CP unmixing procedure. When tested on mixtures of labeled *E. coli* strains, the SFS/CP approach could easily extract the contribution of at least 4 overlapping FPs. Furthermore, the proposed method allowed to monitor simultaneously the expression of iron responsive genes and pyoverdine production in *P. aeruginosa*. The data and tools presented herein will facilitate the selection of FPs for multiplex fluorescent whole-cell biosensing and signal processing.

Introduction

Fluorescent proteins (FPs) have become valuable tools for investigating biological processes in living cells. Their unique ability to emit fluorescence in both eukaryotic and prokaryotic cells with no substrate or cofactor requirement makes them suitable biochemical markers for a variety of biological applications. FPs are regularly used, for instance, as reporters for non-invasive monitoring of gene expression as well as for studying subcellular localization and dynamics of proteins (1). In ecological studies, they can serve as tags to track bacteria in complex environmental matrices such as biofilms or soils, and to survey mutualistic or pathogenic associations that bacteria form with plants or animals (2). Another broad application area is the development of whole cell bacterial sensors, which typically relies on gene fusions between a stress responsive promoter and a reporter gene (e.g., green fluorescence protein (GFP)). With the advances in the emerging field of synthetic biology, FPs are now commonly used as output reporters to quantify the dynamic behavior of biological components from artificial genetic circuits (3, 4).

The last decade has seen the emergence of a wide variety of new FP variants with fluorescence emission ranging from blue to near infrared and featuring, even in a same spectral category, improved photophysical properties including brightness, fluorophore maturation rate and photostability. The

availability of such an ever growing collection of FPs offers the opportunity for multicolor labeling studies, where different components of biological systems and their interactions can be monitored simultaneously by mean of micro- or spectroscopic technics (5, 6). However, the combined use of multiple FPs is often limited by the overlaps among their fluorescence spectra. While the simultaneous detection of two or three spectrally distant FPs is commonly achieved using appropriate optical filters, significant spectral overlaps inevitably appear as the number of FPs increases, thereby complicating the accurate separation of individual signals in the mixture. This limitation can be overcome through linear spectral unmixing approaches, which determine the contribution of each fluorophore in the overall fluorescence data, assuming that the mixed spectrum is a the linear combination of the reference spectra of all involved fluorophores (7). To do so, the spectral properties of each spectrum component must be known for reliable spectral unmixing. This is however rarely the case in biological systems since the spectra of fluorophores are subject to experimental and biological fluctuations (e.g. cell type, pH, temperature) and may differ from the reference ones. Furthermore, inherent cellular autofluorescence and background fluorescence should be defined spectrally before unmixing calculation to be subtracted from the actual fluorophore signals. Several alternative methods allowing blind spectral separation of multiple unknown fluorescent sources have been proposed, among which we may cite Principal Component Analysis (PCA) or Non Negative Matrix Factorization (NMF) (8). A multidimensional extension of these bilinear decompositions is the Canonical Polyadic (CP) decomposition or Candecomp/Parafac (9)(10) which has very interesting uniqueness properties (11)(12)(13). This strong feature makes it an attractive exploratory tool that generally provides significant insights about the underlying structure of the spectral data. While the method has gained interest in chemometrics and food technology, applications to quantify fluorophores in biological systems are still scarce (14).

In this context, the present study had two aims. The first was to characterize a set of recently developed FPs that have been seldom used in bacteria to assess their performance as fluorescent label in different hosts. This issue was addressed through the comparative analysis of FPs for toxicity and brightness when expressed from a promoter probe vector in *E. coli* and three other Gram-negative model bacteria. The second aim was to develop a method for the recording and analysis of multiple fluorescent signals from mixtures of whole cell bioreporters. The approach relies on the acquisition of spectra by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) combined with blind CP decomposition of the fluorescence data to discriminate FP signals from autofluorescence or extrinsic fluorescent compounds. Because of the synchronous scanning of both excitation and emission wavelengths, SFS acquisition provides narrower and more symmetric fluorescence spectra in a wider spectral range (15). This scan functionality results in a higher spectral selectivity for the monitoring of fluorescence sources. By reducing spectral bleed through, SFS serves as a simple and useful “single run” method for the simultaneous determination of fluorescent components in complex mixtures (16). In the present work, we first applied the combined SFS/CP approach to mixtures of *E. coli* strains expressing fluorescent proteins with overlapping spectra. The method was then used to monitor the expression of iron responsive genes and siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. Bacteria were routinely grown aerobically on LB agar or in LB broth. Deferrated casamino acids medium (DCAA medium (17)) was used in iron sensing assays with *Pseudomonas aeruginosa*. *E. coli* and *P. aeruginosa* were grown at 37°C, whereas *P. putida* and *Shewanella oneidensis* were grown at 28°C. When required, the medium was supplemented with kanamycin at final concentrations of 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (for *E. coli*, *P. putida* and *S. oneidensis*) or 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (for *P. aeruginosa*).

Detailed methods for construction of plasmids used in this work are described in the supplemental material. Briefly, the fluorescent reporter pPB plasmid series was obtained by replacing the *gfp* gene of pPROBE'-*gfp*[LVA] (18) by 13 different fluorescent reporter genes. A second set of vectors designated pPB-lac was also constructed by inserting the LacI-repressible $P_{A11/O4/O3}$ promoter (19) upstream each reporter gene in pPB plasmids.

The *E. coli* strain XL10-Gold carrying *lacI^q* was used as a host of pPB-lac plasmids to assess the toxicity of FPs through isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction assays. The *E. coli* strain TOP10 lacking the LacI repressor served as a host of pPB-lac plasmids for the comparative analysis of FPs production in different bacterial species.

Table 1 : Properties of fluorescent proteins in vitro and in living *E. coli* cells.

Protein	I_{ex}^a	I_{em}^a	QY ^b	Bright- ness ^b	Matu- ration ^c	I_{SFS}^d	FWHM SFS ^e	FWHM em. ^f	SFS peak height ^g	Reference ^h
mTagBFP2	399	454	0.64	33	0.2	422	27	59	44	(40)
EcFbFP	449	495	0.39	5	ND	468	26	70	7	(41)
E2-Red Green (Green) /	484	498	0.06	6	0.4	480	23	31	16	(24)
EGFP	488	507	0.60	34	0.3	490	28	31	80	(42)
Clover	505	515	0.76	84	0.5	502	21	30	220	(29)
TurboYFP	525	538	0.53	56	ND	519	22	33	130	Evrogen
E2-Orange	540	561	0.54	20	1.3	540	24	39	40	(24)
mOrange2	549	565	0.60	35	4.5	543	24	42	45	(43)
DsRed- Express2	554	591	0.42	15	0.7	558	27	48	35	(22)
mRuby2	559	600	0.38	43	2.5	560	29	57	15	(29)
E2-Red Green (Red) /	560	585	0.67	36	1.2	561	27	49	28	
mCherry	587	610	0.22	16	0.7	584	29	44	11	(44)
mNeptune2.5	599	643	0.28	27	0.5	606	33	90	10	(45)
E2-Crimson	605	646	0.12	7.1	0.4	610	33	64	8	(25)
mCardinal2	604	659	0.19	17	0.5	604	38	80	9	(45)

^a λ_{ex} and λ_{em} are the excitation and emission maxima in nm, respectively

^b QY is the quantum yield and brightness is the product of QY and extinction coefficient (not provided).

^c Time in hour for fluorescence to reach half-maximal value after exposure to oxygen

^d Maxima of synchronous fluorescent spectra at a constant offset value $\Delta\lambda = 20$ nm

^e FWHM (Full-Width Half-Maximum) of synchronous fluorescent spectra acquired at $\Delta\lambda = 20$ nm

^f FWHM of emission spectra at absorption maxima

^g Fluorescence peak intensity for synchronous scan performed at $\Delta\lambda = 20$ nm, expressed as relative fluorescence units (RFU) normalized to cell density. The photomultiplier detector operated at a voltage of 650V.

Fluorescence data for ^d, ^e, ^f and ^g were obtained from cultures of *E. coli* TOP10 expressing FP constitutively

^h Source of data for ^a, ^b and ^c.

ND : Not determined

General DNA manipulation

DNA manipulations were performed following standard molecular biology techniques. Enzymes were purchased from Thermo Scientific. Plasmids extraction and DNA cleanup were performed by using Nucleospin miniprep and Nucleospin gel and PCR cleanup columns (Macherey Nagel), respectively. PCR primers were purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). PCR amplifications

were carried out with DreamTaq DNA Polymerase from Thermo Scientific. All constructs were verified by DNA sequencing (Eurofins Genomics). Plasmids were introduced in *P. aeruginosa*, *P. putida* and *S. oneidensis* by electroporation following the method of Choi et al. (20)

Assessment of FPs toxicity

To measure the impact of fluorescent protein expression on the growth of *E. coli*, overnight LB cultures of XL10-Gold strains transformed with pPB-lac-based plasmids were diluted in fresh LB medium to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.05 and incubated for 30 min at 37°C with agitation. The cultures were then splitted in two halves, and one half was induced with 0.5 mM IPTG. Two hundred microliters of each culture was transferred in triplicate to clear bottom 96-well microplates (Eppendorf). Bacterial growth was monitored using a BioTek Synergy microplate reader with continuous shaking at 37°C and absorbance measurement every 15 min for 16h. Growth parameters (i.e. lag time and maximum growth rate) were calculated with the program GrowtRates (21)

Fluorescent protein expression in different bacterial hosts

The expression of fluorescent proteins in strains transformed with pPB-lac plasmids was quantified using an FLX-Xenius spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). 24h-old LB cultures were centrifuged washed in saline solution (NaCl 0.8%) and suspended in the same solution to an OD_{600} of 0.1-0.2. Fluorescence of cell suspensions was quantified at peak excitation and emission wavelengths (Table 1) and expressed as relative fluorescence units (RFU) normalized to cell density. A constant photomultiplier voltage was used to compare the expression of individual fluorescent proteins in different host strains.

Cultures of *E. coli* TOP10 expressing FP constitutively were also analyzed by synchronous fluorescence spectroscopy for a comparative analysis of in vivo FP brightness. Following spectra acquisition (see below), the in vivo brightness was estimated from the fluorescence maximum intensity normalized to cell density.

Mixture of different fluorescent E. coli strains

Serial dilutions of cell suspensions were obtained from four different *E. coli* TOP10 strains, each expressing a particular fluorescent protein (EGFP, TurboYFP, E2-Orange and DsRed-Express2). Cell suspensions were mixed in defined ratios in black 96-well microplates (Eppendorf Microplate 96/V), with a mixing pattern designed to generate a tri-linear data set of four overlapping fluorescent signals useable by the signal processing method (Candecomp/Parafac) described below. Mixtures were prepared using an automated pipetting system (Eppendorf epMotion 5070) as follows: overnight LB cultures were washed twice in NaCl 0.8% and cell density was adjusted to OD_{600} of 2 (approx. 8.10^8 cells.mL⁻¹). First, cell suspensions of either TOP10/pPROBE-NT'Lac (GFP) or TOP10/pPB-lac-Y538 (TurboYFP) were 1.65-fold serially diluted six times in a deepwell plate (Eppendorf) until reaching a 20 times dilution (1.65^6). Similarly, TOP10/pPB-lac-O561 (E2-Orange) and TOP10/pPB-lac-R591 (DsRed-Express2) were diluted in the same plate but using a 3-fold serial dilution to avoid collinearity between the two sets of dilution. The untransformed TOP10 strain was used as a diluent to maintain a constant cell concentration in the wells. Diluted cell suspensions were then mixed in a second microplate following the ratios indicated in figure S1. From column 1 to 7 the concentration of fluorescents reporters varied whereas from line A to E the ratios between reporters varied, while the cell density remained constant ($OD_{600}=2$). Thus, the contribution of each fluorescent protein decreased or increased as a function of the dilution rank or of the mixing ratio. As a benchmark, microplates were prepared following the same pattern for each fluorescent strain mixed with untransformed TOP10 strains.

Mixture of P. aeruginosa iron bioreporter strains

Overnight LB cultures of the two iron bioreporters *P. aeruginosa* PAO1/pPB-bftB-O561 and PAO1/pPB-pvdA-R591 were washed twice in DCAA medium and suspended in the same medium to an OD_{600} of 0.1. The two cell suspensions were then mixed in a black polypropylene 96-well microplate and supplemented with different dilution of FeCl₃ with an automated pipetting system

(Eppendorf epMotion 5070) in a final volume of 200 μl as follows: from column 1 to 12, iron concentration serially decreased 3-fold, from 2 mM FeCl_3 (column 1) to 11 nM FeCl_3 (column 12). From lane A to G, we linearly varied the ratio of bioreporter suspensions from 95% of PAO1/pPB-bfrB-O561 and 5 % of PAO1/pPB-pvdA-R591 (line A) to 5% of PAO1/pPB-bfrB-O561 and 95 % of PAO1/pPB-pvdA-R591 (lane G). The microplate was incubated at 37°C with shaking (130 rpm) under humid atmosphere to limit evaporation for 48h before fluorescence measurement.

Synchronous Fluorescence Spectra acquisition

Before fluorescence reading, cell suspensions were briefly homogenized with a MixMate vortex mixer (Eppendorf). Synchronous fluorescence spectra (SFS) were performed in 96 well microplates using a two-grating monochromator spectrofluorometer FLX-Xenius (SAFAS, Monaco), equipped with a 150 W Xenon lamp as the excitation source. The SFS analysis of cell suspensions was measured in the excitation wavelength range of 400–700 nm at a constant offset value $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}} = 20$ nm, which gave the best sensitivity and sharpest peaks among the tested offsets (i.e. 15, 20, 30, 40 nm). Spectra were recorded with a spectral step of 2 nm and a mean scan speed of 600 nm.min⁻¹. The excitation and emission slits width were 10 nm and the photomultiplier voltage set at values between 650 and 800 V. Raw fluorescence signals (without filtering or smoothing) were collected and exported for further signal processing with Candecomp/Parafac algorithms running under Matlab software.

Synchronous spectrum of purified pyoverdine (Sigma-Aldrich, catalog no. P8124) was measured in a similar way in DCAA medium.

Candecomp/Parafac (CP) decomposition

The multi-way analysis of spectral data by CP algorithm provided multilinear decomposition of a data matrix without any a priori information about the FP spectra. In this work, it was assumed that synchronous fluorescent spectra coming from different batches are indicative of various mixtures of R fluorescent components. Each of the R fluorescent component spectrum, termed as the r^{th} source ($r=1, \dots, R$), is mathematically represented by a vector $\mathbf{s}_r = [s_{r1} \cdots s_{rN}]^T$ made of N entries, i.e. the fluorescence intensities at each wavelength. Thus, the acquisition of SFS spectra as a function of two crossed parameters ($M \times P$ values; e.g. biosensors ratio vs. iron concentration) generated a three-way data array \mathcal{X} (three-order tensor), which can be expressed by the following tri-linear CP model:

$$\mathcal{X}_{m,p,n} = \sum_{r=1}^R a_{rm} \cdot b_{rp} \cdot s_{rn} + \mathcal{F}_{m,p,n}$$

where R is the number of fluorescence sources (i.e. decomposition rank). \mathcal{F} is the residual error term (three-order tensor) including experimental error, signal noise or ‘non-linear’ component behavior. An equivalent representation is given by the following equation:

$$\mathcal{X} = [[\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{S}]] + \mathcal{F}$$

where the three matrices \mathbf{A} (M -by- R), \mathbf{B} (P -by- R) and \mathbf{S} (N -by- R) are respectively obtained by stacking the vectors \mathbf{a}_r , \mathbf{b}_r and \mathbf{s}_r . The main interest of the CP decomposition comes from its good uniqueness properties (11), meaning that the matrices \mathbf{A} , \mathbf{B} and \mathbf{S} can be uniquely estimated from the data \mathcal{X} under mild conditions. Moreover, even in difficult situations such as the presence of collinear vector in one mode (matrix), the addition of supplementary mathematical constraints such as the positivity of the different matrix entries, coupled with unimode uniqueness results of Guo et al. (13) yields a unique non negative CP decomposition. After selecting the expected number of fluorescent sources (R), the estimation of the unknown three matrices (\mathbf{A} , \mathbf{B} and \mathbf{S}) was achieved by a non-negative alternating least-squares algorithm with a random initialization of the three matrices. The code implemented herein was developed by Bro (10) and is available in the Matlab N-way toolbox.

With SFS data set presented herein, performing the tri-linear CP decomposition yields the three matrices \mathbf{S} (N -by- R matrix), \mathbf{A} (M -by- R matrix), \mathbf{B} (P -by- R matrix) representing respectively estimates

of the R source spectra and the corresponding parameters profiles to the M and P values of the two parameters. The rank R of the decomposition (i.e. the number of sources R) is assessed iteratively by observing the decrease of the energy of the fitting error \mathcal{E} as the number of components is increasing.

Results and Discussion

Development and validation of fluorescent protein-based promoter probe vectors

We constructed a set of promoter probe vectors utilizing different fluorescent reporter proteins in order to develop a method for multispectral analysis of bacterial bioreporters. The constructs were based on pPROBE'-GFP[LVA], a broad host range *gfp* reporter plasmid from the pBBR incompatibility group often used in studying gene expression or in *gfp* labeling of Gram-negative bacteria (18). We first sought to select from the literature a list of FPs featuring the best compromise between brightness, maturation rate and photostability in each spectral class. When available, data on the potential FP cytotoxicity were also taken into consideration in our choice (22). The selected proteins together with their principal characteristics are listed in Table 1. The list includes one blue FP, two green FPs, one yellow FP, two orange FPs, two red and three far-red FPs, as well as a dual-color FP with both red and green emission (E2-Red/Green) and a flavin mononucleotide-based FP (EcFbFP) that can be used as a fluorescent reporter in anaerobic biological systems. We inserted the fluorescent reporter genes in pPROBE'-GFP[LVA] in place of the *gfp* gene. The exchange left unmodified the original improved translation initiation region upstream the reporter genes and introduced three consecutive stop codons downstream the multiple cloning site to prevent any translational read through from cloned DNA fragments. Because the expression of each fluorescent reporter can be influenced by the nature of the ribosome binding site (RBS) (23), unique XbaI and NdeI restriction sites were introduced on both sides of the translation initiation region to facilitate swapping with another desired RBS sequence.

Table 2 : Effect of fluorescent protein overexpression on the growth of *E. coli* XL10 Gold.

Protein	Doubling time (min) ^a	Lag time (min) ^a
mTagBFP2	85 ± 2	225 ± 2
EcFbFP	92 ± 2.9	45 ± 1.1
EGFP	90 ± 2.4	120 ± 4
Clover	78 ± 1.8	111 ± 0.7
TurboYFP	110 ± 1.7	38 ± 0.6
E2-Orange	82 ± 3.3	74 ± 5.3
DsRed-Express2	82 ± 3	156 ± 4.9
E2-Red/Green	81 ± 1.1	72 ± 2
mRuby2	82 ± 1.5	90 ± 2
mCherry	84 ± 1	92 ± 1.8
mNeptune 2.5	78 ± 1	176 ± 2.4
E2-Crimson	86 ± 1.5	112 ± 5.5
mCardinal2	101 ± 1.3	211 ± 3.5
XL-10 Gold Control	74 ± 1.6	33 ± 1

^a Standard deviations are calculated from three separate cultures

The usefulness of such reporter constructs relies on both a low toxicity of the expressed protein and broad expression host range. As a matter of fact, several applications involving fluorescent proteins in microbial biotechnology, e.g. whole-cell labeling, may require the FP to be expressed at high levels in the cell. Such an overexpression can lead to bacterial growth inhibition due to FP toxicity, as observed for many orange and red FPs (22)(25), thereby limiting their utility as cellular labels. To test whether the FPs we selected were toxic, the strong LacI repressible promoter P_{A1/O4/O3} was cloned upstream each reporter gene in pPB plasmids and the resulting gene fusions were introduced into *E. coli* XL10-Gold cells. Transformants cultured under repressing conditions, i.e. with no added IPTG, showed almost identical growth characteristics to the untransformed strain. Under derepressing conditions however, the growth properties of transformants were affected to different extents (Table 2). While the untransformed control strain had a doubling time of 74 min, modest, yet significantly higher, values ranging from 81 to 92 min were measured for most tested strains, including those producing GFP (G=90 min), mCherry (G=84 min) and several orange and red FPs, which have no reported toxicity to bacteria (25)(26). Thus, the increased doubling time observed in these cases may not result from FP toxicity per itself, but rather from the cellular burden associated with gratuitous protein overexpression (27). The most pronounced effect on *E. coli* growth rate could be seen with mCardinal2 and TurboYFP, with doubling times of 101 min and 110 min, respectively. Lag times, i.e. the times to

enter exponential growth after IPTG addition, were highly variable and ranged from 38 min for cells producing TurboYFP to 225 min for mTagBFP2. This growth parameter could also reflect FP toxicity since FP producing cells with extended lag times generally formed small colonies under derepressing conditions, as did cells with long doubling times (not shown). It is noteworthy that increased doubling times and extended lag times values did not correlate and are therefore likely to represent different cellular stresses.

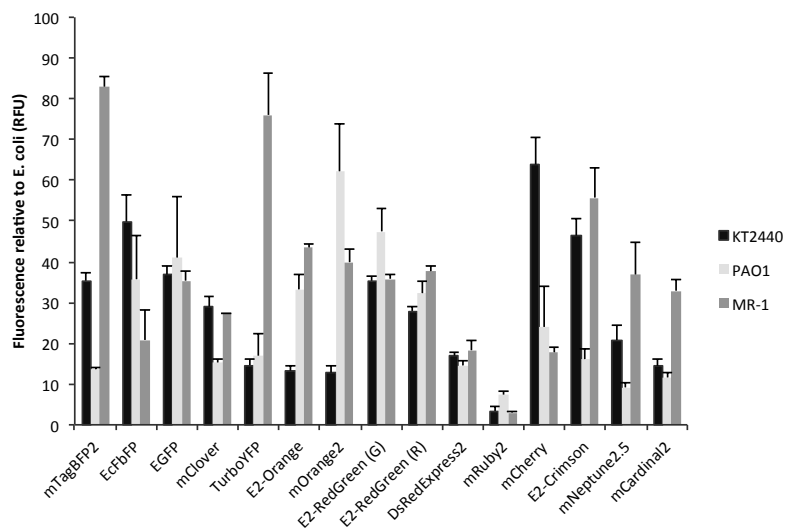


Figure 1 : Expression of fluorescent proteins from the constitutive promoter $P_{A1/O4/O3}$ in different Gram-negative bacteria. *E. coli* TOP10, *P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1 and *S. oneidensis* MR-1 strains transformed with pPB-lac plasmids were grown in LB for 24h and fluorescence intensity was determined at peak excitation and emission wavelengths with a fixed signal gain setting for each fluorescent protein. All measurements were carried out in triplicate, normalized to the cell density and are shown in relative fluorescence units (RFU). The fluorescence data for KT2440, PAO1 and MR-1 strains were normalized to the fluorescence level of *E. coli* TOP10 strains arbitrarily set to 100 RFU.

The influence of the bacterial host on the expression of the FPs was assessed by comparing the expression properties of all pPB-lac constructs in three Gram-negative model bacteria, i.e. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an important opportunistic pathogen, the metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas putida* KT2440 and *Shewanella oneidensis* MR-1, a dissimilatory metal-reducing bacterium with diverse respiration capability. FP production was measured from overnight cultures of pPB-lac-transformed strains and compared with that of transformed *E. coli* TOP10 strain. Because the plasmids differ only by the FP coding sequence, it could be expected that FP production would depend essentially on the strength of the $P_{A1/O4/O3}$ promoter, which acts as a constitutive promoter in all tested strains. Quantitative fluorimetry analysis revealed that the highest FP production indeed occurred in *E. coli* (Fig. 1). This could be awaited for proteins whose expression is driven by a promoter from *E. coli* and that have been engineered, for the majority, using this bacterium as a host. However, large variations in the relative brightness of FPs were found between each host. For example, strains TOP10, PAO1, KT2440 and MR-1 producing TurboYFP showed a fluorescence ratio of 100:19:16:84 while a ratio of 100:27:70:19 was measured for mCherry. The largest variation was observed with KT2440 and MR-1 expressing mRuby2, which exhibited only 1/20th fluorescence of that measured in *E. coli* TOP10 (Fig. 1). These data indicate that the brightness of FPs in bacteria not only depends on the host and expression efficiency, but is also determined by additional parameters such as mRNA and protein stability, and efficiency of chromophore maturation (1) (28). Therefore, choosing the best FP for labeling a particular bacterium requires testing several candidates since their performance in vivo cannot be extrapolated from their in vitro characteristics.

Characterization of FP labeled *E. coli* cells by synchronous fluorescence spectroscopy.

Synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) is an increasingly popular tool for analyzing complex mixtures of fluorescent compounds. The combination of SFS with appropriate mathematical data

processing tools enables the decomposition of complex fluorescent spectra into their components. To assess the gain provided by SFS compared to conventional fluorescent spectroscopy in differentiating mixtures of fluorescently labeled bacteria, we first recorded the fluorescent spectra of *E. coli* TOP10/pPB-lac by synchronous scanning and compared them to excitation and emission spectra. In the example provided (Fig. 2), GFP, E2-Orange and mCherry exhibit relatively broad and asymmetrical excitation-emission spectral profiles with a significant degree of overlap. In contrast, the fluorescence signal in the synchronous spectra is confined in Gaussian shaped and much narrow peaks, which results in lower spectral overlap between all three FPs.

This spectral simplification and bandwidth narrowing also applies to all tested FPs, as indicated by the systematic reduction of full width at half maximum (FWHM) of spectra acquired synchronously compared to emission peaks (Table 1). It is also noteworthy that the peak position, bandwidth and intensity in synchronous spectra depend on the wavelength offset $\Delta\lambda$ (i.e. fixed wavelength interval between excitation and emission monochromators). Therefore, the $\Delta\lambda$ can be tuned in order to amplify signals of interest or to limit interferences. Generally, we observed that fluorescence maxima shifted to shorter wavelengths with increasing $\Delta\lambda$, and sharper and narrow peaks were obtained for $\Delta\lambda$ ranging from 15 to 30 nm. For the rest of this work, we chose a $\Delta\lambda=20$ nm which corresponds roughly to the mean Stokes shift (i.e. the difference between absorption and emission maxima) of the studied fluorescent proteins (Table 1).

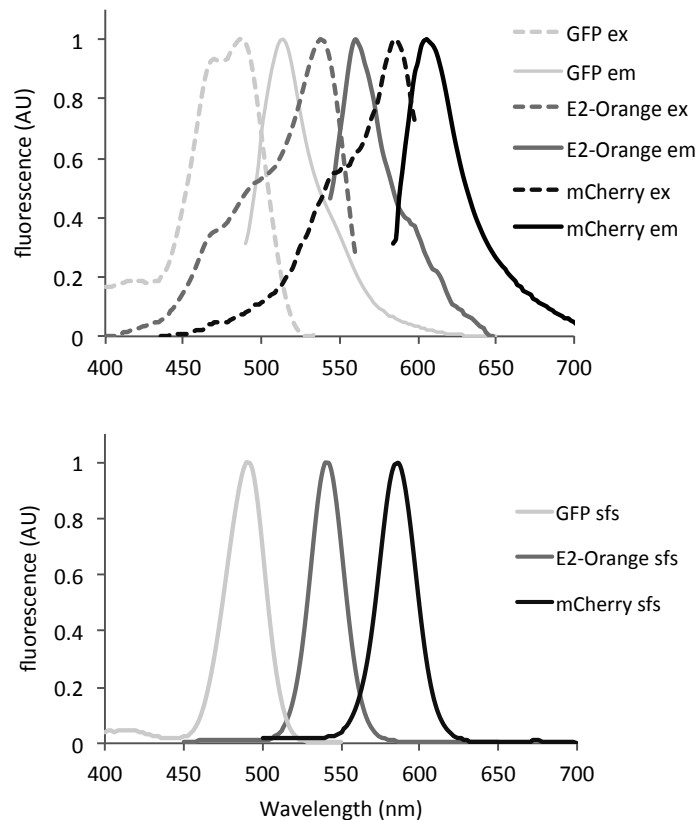


Figure 2 : Fluorescence spectra of GFP, E2-Orange and mCherry. Shown are normalized excitation and emission (A) and synchronous (B) fluorescence spectra of cultures of *E. coli* expressing GFP, E2-Orange and mCherry.

Synchronous scans of *E. coli* cultures expressing different FPs were performed at this offset and with a fixed signal gain to compare their brightness *in vivo*. The best performances were observed for Clover and TurboYFP, which were approximately 2.7- and 1.6-fold brighter than EGFP, respectively (Table 1), while EcFbFP was the dimmest FP with only one tenth the brightness of EGFP. *In vivo*, the observed fluorescence levels tend to parallel the *in vitro* FP brightness with however some exceptions including mRuby2, which exhibited relatively poor fluorescence intensity despite being considered as the brightest red FP to date (29). Even though a suboptimal $\Delta\lambda$ may contribute to such apparent low

brightness in *E. coli*, this example suggests, as before, that factors other than the intrinsic photophysical properties of FPs (e.g. mRNA stability, translation efficiency or chromophore maturation) participate to their brightness *in vivo*.

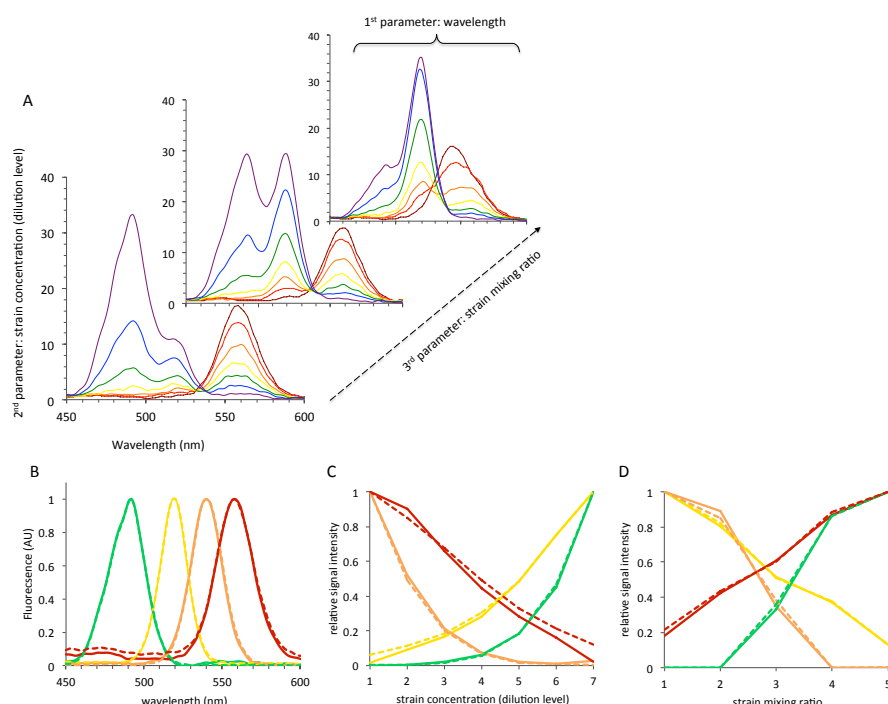


Figure 3: Synchronous spectra acquisition and CP decomposition of fluorescence from mixtures of four *E. coli* TOP10 strains expressing different FPs constitutively. (A) Typical SFS dataset of FP labeled strains mixtures (excerpt of 11 spectra out of 35). (B-D) Outcomes of CP decomposition. The fluorescence profiles estimated from CP analysis of mixtures of FP labeled strains (solid lines) are compared to those obtained from single labeled strains benchmarks (dashed lines). (B) Fluorescence profile as a function of labeled strain concentration (dilution level). (C) Synchronous fluorescent spectra. (D) Fluorescence profile as a function of strains mixing ratio. The mixture pattern for this experiment is presented in supplemental figure S1. YFP: turboYFP; E2O: E2-Orange; DsRed: DsRed-express2.

The substantial bandwidth narrowing obtained by SFS suggested it could facilitate the extraction of individual signals in complex fluorescent mixtures. In this context, we constructed complex fluorescent signals by mixing four different TOP10 *E. coli* strains expressing FPs (GFP, TurboYFP, E2-Orange or DsRed-Express2) constitutively, and simulated variation of FP expression using different strain ratios and strain concentrations (see material and methods for detailed dilution protocol). Next, we applied the SFS procedure to each mixture and tested the ability of Candecomp/Parafac (CP) algorithm to extract the contribution of individual FPs. Altogether, the trilinear dataset of four overlapping fluorescent signals could be decomposed and compared to benchmark experiments involving single labeled strains treated in the same conditions, as depicted in Figure 3. Before CP decomposition, the fluorescence dataset appeared as a pool of 35 SFS multi-peak records (Fig. 3A). The CP blind decomposition clearly shows that (i) the four fluorescence sources in the mixture could be reliably identified, as judged by the estimated spectra that nearly superimposed with those of the four FPs tested individually (Figure 3B), and (ii) the estimated sources of fluorescence in the mixture behave almost exactly as did fluorescence from individual FP reporter strains with the same level of dilution and relative concentration. (Figures 3C and 3D, respectively). These results show for the first time that the coupled SFS/CP approach could solve the issue of FP bleed-through in multicolor labeling experiments, even in scenarios involving high spectral overlapping FPs such as E2-Orange and DsRedExpress2, whose synchronous fluorescence peaks are separated by only 18 nm (Table 1).

Application of the coupled SFS/CP approach to study iron homeostasis in P. aeruginosa

Having demonstrated the proof of principle of SFS/CP on artificial mixtures of labeled bacteria, we tested its usefulness through the monitoring of combined *P. aeruginosa* iron bioreporters. Like most bacteria, *P. aeruginosa* must tightly regulate cellular iron acquisition and storage to prevent the deleterious effects of iron deficiency and iron excess (30). Under iron restriction condition, *P. aeruginosa* produces two high-affinity iron chelating siderophores named pyoverdine and pyochelin that serve to deliver iron to the cell. The important fluorescence background noise caused by these siderophores prompted us to assess the relevance of our SFS/CP methodology. We then investigated the behavior of the *pvdA* and *bfrB* genes, two iron responsive genes from *P. aeruginosa* that display opposite iron-dependent transcriptional regulation. The *pvdA* gene encoding a L-Ornithine N⁵-oxygenase involved in an early step of the pyoverdine synthesis, is repressed by iron. In contrast, the expression of the bacterioferritin encoding gene *bfrB* is induced under iron replete condition. Two *bfrB-E2Orange* and *pvdA-DsRedExpress2* gene fusions were constructed in pPB plasmids and introduced into *P. aeruginosa* PAO1. The resulting iron bioreporter strains were mixed in defined ratios and grown in the presence of different iron concentrations before SFS acquisition. From CP decomposition of the spectral data, four fluorescent sources could be identified: two of them unambiguously corresponded to E2-Orange and DsRed-Express2, the two others peak at 416 nm and 450 nm (Fig. 4B). The contribution of E2-Orange to the overall fluorescence increased with iron concentration, whereas the DsRed-Express2 signal increased upon iron depletion (Fig. 4A), which is well in line with previously described expression of *pvdA* and *bfrB* genes from PAO1 (31)(32). However, the iron-dependent induction profile of *bfrB::E2Orange* showed a transient decrease around 25 μM FeCl_3 . This particular behavior was reproducible in a wild type PAO1 strain but was not observed in a *pvdA* mutant strain (data not shown), suggesting subtle interaction between pyoverdine-mediated iron uptake system and bacterio-ferritin that would deserve further investigations. The two other fluorescent sources (denoted sources 1 and 2) behave similarly as the expression profile of *pvdA::DsRedExpress2* with respect to iron concentration (Fig. 4A) and were almost unaffected by variation of the bioreporter strains ratios (Fig. 4C), suggesting they could correspond to one or two of the siderophores pyoverdine or pyochelin. Nevertheless, SFS control experiments carried out on strain *P. aeruginosa* PAO1 Δ *pvdA* lacking pyoverdine led to the complete disappearance of the signals corresponding to sources 1 and 2, thus ruling out the possible contribution of pyochelin. This was partly confirmed by the SFS analysis of purified pyoverdine, which showed a single band matching with the 416 nm fluorescent source 1 (Fig. 4C and 4D). The nature of the second source at 450 nm is still uncertain, but appears to be linked to pyoverdine production (Fig. 4D). Romanowski et al. (33) also observed a major fluorescent peak at around 490 nm in addition to the characteristic emission band of pyoverdine in phosphate-limited cultures of PAO1, however its origin was not investigated. A possible explanation for this fluorescent signal would be the particular biotic or abiotic interactions that pyoverdine or a fluorescent precursor can have with components of the local microenvironment (34).

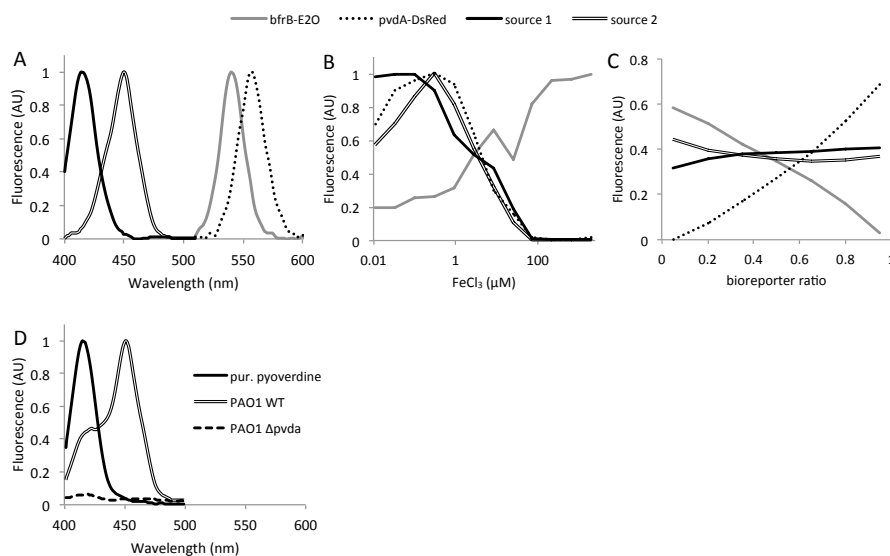


Figure 4 : (A-C) Spectral decomposition of fluorescence from mixtures of *P. aeruginosa* PAO1 iron bioreporter strains harboring *pvdA*-DsRed-Express2 and *bfrB*-E2-Orange fusions. Shown are the spectra (A) of the four fluorescent sources identified from CP analysis and their profile as a function of iron concentration (B) and the ratio of bioreporter strains in the mixture (C). The mixture pattern for this experiment is presented in supplemental figure S2. (D) Synchronous spectra of purified pyoverdine (solid line) and cultures of PAO1 wild type (WT, dashed line) and PAO1 $\Delta pvdA$ (large dashed lines) cells grown in low-iron DCAA medium. The later spectrum was normalized with respect to that obtained for PAO1 wild type strain.

The SFS/CP approach used here enabled to monitor reliably and simultaneously the expression of the *bfrB* and *pvdA* genes along with pyoverdine production, thus proving again its ability to integrate multiple signals from combinations of fluorescent whole cell bioreporters. Numerous applications can be envisioned for this methodology including, for instance, characterizing the behavior of natural and synthetic genetic networks (35)(36), monitoring the activity of different fluorescent labeled bacteria in complex environmental samples (37), the detection of multiple pollutants in a same sample (38) or the calibration of bioreporter assays (39). Furthermore, the approach is not restricted to the analysis of genetically encoded fluorescent signals and could be expanded, as demonstrated here with the detection of pyoverdine, to any compound that emits a quantifiable fluorescence such as organic dyes or quantum dots.

In summary, we have developed a series of promoter probe vectors for the expression of a 14 different FPs spanning the visual spectrum in Gram-negative bacteria. Most tested FPs showed no obvious toxicity when overexpressed in *E. coli*, i.e. did not affect bacterial growth more than did GFP. All of them were found to be functional in *P. aeruginosa*, *P. putida* and *S. oneidensis*, yet with variable levels of fluorescence production. These data will direct the choice of appropriate FPs for fluorescent reporter studies in these model bacteria, however because of strain-to-strain variations, we recommend testing the performance of several candidates for other bacteria.

This work also introduces a spectroscopic approach for multiplex fluorescent bacterial biosensing. We show that SFS offers a simple and efficient means, not only of narrowing and simplifying spectra of FPs, but also of recording signals from FP mixtures in a single scan. Application of the popular CP decomposition tool to synchronous spectral array data obtained from artificial mixtures of FP labeled *E. coli* strains led to successful blind identification of each FP components. Moreover, the analysis of *P. aeruginosa* iron bioreporters mixtures revealed unexpected regulation of gene involved in iron homeostasis along with pyoverdine-related fluorescent signals that would not have been detected by other methods.

Although the proposed SFS/CP approach provides a qualitative determination of mixed fluorescent signals at the moment, the expansion to quantitative analysis is achievable and currently under development using the standard addition method or through incorporation of an internal fluorescent standard.

Acknowledgements

We thank Ehud Banin for the kind gift of *P. aeruginosa* strains and Ole Nybroe for providing pJBA28. We thank Benjamin Glick, Robert Keenan, Michael Lin, Vlasdislav Verkhusha for making fluorescent proteins publicly available through Addgene and Roger Tsien for providing mOrange2 construct. We are also grateful to Christophe Merlin for critical reading of the manuscript. This work was supported by the French ANR project HÆSPRI (ANR-09-BLAN-0336-04). Damien Parrello is a recipient of a grant from the same program.

References

1. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* 90:1103–1163.
2. Larrainzar E, O’Gara F, Morrissey JP. 2005. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:257–277.
3. Ghim C-M, Lee SK, Takayama S, Mitchell RJ. 2010. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep.* 43:451–460.
4. Van der Meer JR, Belkin S. 2010. Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:511–522.
5. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2:905–909.
6. Day RN, Davidson MW. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* 38:2887–2921.
7. Zimmermann T. 2005. Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy, p. 245–265. *In* Rietdorf, J (ed.), *Microscopy Techniques*. Springer Berlin Heidelberg.
8. Neher RA, Mitkovski M, Kirchhoff F, Neher E, Theis FJ, Zeug A. 2009. Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophys. J.* 96:3791–3800.
9. Harshman RA. 1970. Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an “explanatory” multi-modal factor analysis. 16. Working Paper, UCLA, Ann Arbor.
10. Bro R. 1997. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38:149 – 171.
11. Sidiropoulos ND, Bro R. 2000. On the uniqueness of multilinear decomposition of N-way arrays. *J. Chemom.* 14:229–239.
12. Miron S, Dossot M, Carteret C, Margueron S, Brie D. 2011. Joint processing of the parallel and crossed polarized Raman spectra and uniqueness in blind nonnegative source separation. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 105:7–18.
13. Guo X, Miron S, Brie D, Stegeman A. 2012. Uni-mode and Partial Uniqueness Conditions for CANDECOMP/PARAFAC of Three-Way Arrays with Linearly Dependent Loadings. *SIAM J. Matrix Anal. Appl.* 33:111–129.
14. Shirakawa H, Miyazaki S. 2004. Blind spectral decomposition of single-cell fluorescence by parallel factor analysis. *Biophys. J.* 86:1739–1752.
15. Lloyd J. 1971. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature* 231:64–65.
16. Patra D, Mishra AK. 2002. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 21:787 – 798.
17. Visca P, Colotti G, Serino L, Verzili D, Orsi N, Chiancone E. 1992. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2886–2893.

18. Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE. 2000. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 13:1243–1250.
19. Lutz R, Bujard H. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 25:1203–1210.
20. Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* 64:391–397.
21. Hall BG, Acar H, Nandipati A, Barlow M. 2014. Growth Rates Made Easy. *Mol. Biol. Evol.* 31:232–238.
22. Strack RL, Strongin DE, Bhattacharyya D, Tao W, Berman A, Broxmeyer HE, Keenan RJ, Glick BS. 2008. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat. Methods* 5:955–957.
23. Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA. 2009. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat Biotech* 27:946–950.
24. Strack RL, Bhattacharyya D, Glick BS, Keenan RJ. 2009. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *BMC Biotechnol.* 9:32.
25. Strack RL, Hein B, Bhattacharyya D, Hell SW, Keenan RJ, Glick BS. 2009. A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Biochemistry (Mosc.)* 48:8279–8281.
26. Legendijk EL, Validov S, Lamers GEM, De Weert S, Bloemberg GV. 2010. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:81–90.
27. Scott M, Gunderson CW, Mateescu EM, Zhang Z, Hwa T. 2010. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science* 330:1099–1102.
28. Overkamp W, Beilharz K, Detert Oude Weme R, Solopova A, Karsens H, Kovács ÁT, Kok J, Kuipers OP, Veening J-W. 2013. Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 6481-6490
29. Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY, Lin MZ. 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9:1005–+.
30. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215–237.
31. Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML. 2004. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:9792–9797.
32. Tiburzi F, Imperi F, Visca P. 2008. Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 67:213–227.
33. Romanowski K, Zaborin A, Fernandez H, Poroyko V, Valuckaite V, Gerdes S, Liu D, Zaborina O, Alverdy J. 2011. Prevention of siderophore-mediated gut-derived sepsis due to *P. aeruginosa* can be achieved without iron provision by maintaining local phosphate abundance: role of pH. *BMC Microbiol.* 11:212.
34. Valeur B, Berberan-Santos MN. 2012. Structural Effects on Fluorescence Emission, p. 75–107. *In* *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
35. Cox R, Dunlop M, Elowitz M. 2010. A synthetic three-color scaffold for monitoring genetic regulation and noise. *J. Biol. Eng.* 4:10.

36. Ball DA, Lux MW, Graef RR, Peterson MW, Valenti JD, Dileo J, Peccoud J. 2010. Co-design in synthetic biology: a system-level analysis of the development of an environmental sensing device. *Pac. Symp. Biocomput.* 385–396.
37. Hewitt BM, Singhal N, Elliot RG, Chen AYH, Kuo JYC, Vanholsbeeck F, Swift S. 2012. Novel Fiber Optic Detection Method for in Situ Analysis of Fluorescently Labeled Biosensor Organisms. *Environ. Sci. Technol.* 46:5414–5421.
38. Jouanneau S, Durand M-J, Courcoux P, Blusseau T, Thouand G. 2011. Improvement of the identification of four heavy metals in environmental samples by using predictive decision tree models coupled with a set of five bioluminescent bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 45:2925–2931.
39. Wackwitz A, Harms H, Chatzinotas A, Breuer U, Vogne C, Van Der Meer JR. 2008. Internal arsenite bioassay calibration using multiple bioreporter cell lines. *Microb. Biotechnol.* 1:149–157.
40. Subach OM, Cranfill PJ, Davidson MW, Verkhusha VV. 2011. An Enhanced Monomeric Blue Fluorescent Protein with the High Chemical Stability of the Chromophore. *Plos One* 6:e28674.
41. Drepper T, Eggert T, Circolone F, Heck A, Krausz U, Guterl J-K, Wendorff M, Losi A, Gartner W, Jaeger K-E. 2007. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat Biotech* 25:443–445.
42. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33–38.
43. Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5:545–551.
44. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22:1567–1572.
45. Chu J, Haynes RD, Corbel SY, Li P, Gonzalez-Gonzalez E, Burg JS, Ataie NJ, Lam AJ, Cranfill PJ, Baird MA, Davidson MW, Ng H-L, Garcia KC, Contag CH, Shen K, Blau HM, Lin MZ. 2014. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat. Methods* 11:572–578.

Supplemental material

Multicolor whole-cell bacterial sensing using a joint synchronous fluorescence spectroscopy – Candecomp/Parafac-based approach

Supplemental methods

Plasmid pPROBE'-GFP[LVA] (18) served as a backbone for the construction of the pPB plasmid series. For that purpose, we followed a strategy similar to that described by Rochat et al. (2010). The *mcherry*, *morange2*, *clover*, *mneptune2.5* and *mcardinal2* genes were amplified with primer mCheSXFor (5'-GGGCGTCGACTCTAGACTAACTAACTAAAGATTA~~ACTTTATA~~AGGAGGAAAAACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG) including Sall, XbaI, NdeI restriction sites (underlined) and a ribosome binding site (italics) and primer mCheHRev (5'-CTCAAGCTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATG) including a HindIII restriction site, from plasmids pmcherry (Clontech), pcDNA3-mOrange2 (Shaner et al., 2008), pcDNA3.1-Clover-mRuby2 (Addgene plasmid 49089), pcDNA3-mNeptune2.5 (Addgene plasmid 51310) and pNCS-mCardinal2 (Addgene plasmid 52631), respectively. The PCR products were digested with Sall and HindIII and inserted in pPROBE'-GFP-[LVA] in place of the *gfp* gene, creating pPBO565, pPBC610, pPBN643 and pPBC659. Genes encoding E2-Orange and E2-Red/Green were amplified from pE2-Orange-N1 (Addgene plasmid 21719) and pE2-RedGreen-N1 (Addgene plasmid 21720) with primers pE2NFor (5'-CTCCATATGGATAGCACTGAGAACGTC) and pE2HRev (CTCAAGCTTACTACTGGAACAGGTGGTG), digested with NdeI and HindIII and cloned into pPBO565 in place of the mOrange2 gene, yielding pPBO561 and pPBRG585, respectively. The *mTagbfp2* gene was amplified from plasmid pBAD-mTagBFP2 (Addgene plasmid 34632) using primer pair pBFP2-F (5'-CTCCATATGAGCGAGCTGATTAAGGAGA) and pBFP2-R (5'-CAAGCTTAATTCAGCTTGTGCCCCAG) and cloned as above into NdeI-HindIII digested pPBO565 to yield pPBB456. Genes encoding EcFbFP, turboYFP, DsRed-Express2 and E2-Crimson were synthesized de novo after codon optimization for *E. coli* (Eurofins MWG operon) and cloned as above NdeI-HindIII fragments into pPBO565, resulting in plasmids pPBB456, pPBY538, pPBR591 and pPBF646, respectively.

To construct the pPBlac-FP plasmid series, the LacI-repressible $P_{A1/O4/O3}$ promoter (also referred to as PA1lacO-1 in Lutz and Bujard (1997) was amplified from pJBA28 using primers P3 (CAGGTACCATTATCAGGGTTATTGTCT) and P4 (GGTCTAGATGTGTGAAATTGTTATCCG) and inserted as a KpnI-XbaI fragment upstream the fluorescent protein gene in pPB plasmids. The $P_{A1/O4/O3}$ PCR fragment was also cloned into pCR2.1 (Invitrogen) and further subcloned into EcoRI-digested pPROBE-NT' to generate pPROBE-NT'lac.

Iron sensitive reporter plasmids were obtained as follows: the promoter region of the *bfrB* gene from *P. aeruginosa* PAO1 (PA3530-PA3531 intergenic region) was amplified by PCR with bfrB-for (5'-TCGAATTCTCGTCGCTGCCTGAAAAAT) and bfrB-rev (5'-CTCGTCTGACTCTTGTGAGGTGCTGGATG) primers containing EcoRI and Sall restriction sites respectively (underlined) using genomic DNA as a matrix. The 260-bp amplicon was then digested by the Sall and EcoRI and cloned into the pPBO561 plasmid digested with the same enzymes, yielding pPB-bfrB-O561. Similarly, the promoter of *pvdA* (PA2385-PA2386 intergenic region) was amplified by PCR with pvdA-for (5'-CTCGAATTCTGATTCGCTATTCGTGCTC) and pvdA-rev (5'-CTCGTCTGACTTCCAGTTCCTCTGGATTGG) and cloned into Sall and EcoRI-digested pPBR591 to produce pPB-pvdA-R591.

Supplementary figures and tables

FIG S1. Microplate dispensing pattern of FP labeled strains. Seven serially diluted cell suspensions of *E. coli* TOP10 producing GFP (gfp1 to gfp7), TurboYFP (yfp1 to yfp7), E2-Orange (E2or1 to E2or7) and DsRed-Express2 (dsRx1 to dsRx7) were mixed in five different ratios to simulate variation of FP expression. Numbers 1 to 7 represent the dilution rank of the labeled strains, with rank 1 corresponding to undiluted cell suspensions (approx. $8 \cdot 10^8$ cells. mL⁻¹) of TOP10/E2-Orange and TOP10/DsRed-Express2, and rank 7 to undiluted TOP10/GFP and and TOP10/TurboYFP. Dispensed volumes are given in parenthesis.

		Fluorescent strain concentration				
		1	2	7	
Fluorescent strains mix ratio	A	Yfp7 (80µl) /DsRx1 (20µl) E2Or1 (100µl) / gfp7 (0 µl)	Yfp6 (80µl) /DsRx2 (20µl) E2Or2 (100µl) / gfp6 (0 µl)	Yfp1 (80µl) /DsRx7 (20µl) E2Or7 (100µl) / gfp1 (0 µl)	
	B	Yfp7 (65µl) /DsRx1 (35µl) E2Or1 (100µl) / gfp7 (0 µl)	
	C	Yfp7 (50µl) /DsRx1 (50µl) E2Or1 (100µl) / gfp7 (0 µl)	
	D	Yfp7 (35µl) /DsRx1 (65µl) E2Or1 (0µl) / gfp7 (100 µl)	
	E	Yfp7 (20µl) /DsRx1 (80µl) E2Or1 (0µl) / gfp7 (100 µl)	

FIG S2. Microplate dispensing pattern of iron responsive bioreporter strains.

		iron concentration			
		1	2	12
Iron bioreporter mix ratio	A	[FeCl ₃]= 2 mM bfrB::E2orange (95%) pvdA::DsRedexpress2 (5%)	[FeCl ₃]= 0.67 mM bfrB::E2orange (95%) pvdA::DsRedexpress2 (5%)	[FeCl ₃] = 11 nM bfrB::E2orange (95%) pvdA::DsRedexpress2 (5%)
	
	
	D	[FeCl ₃]= 2 mM bfrB::E2orange (50%) pvdA::DsRedexpress2 (50%)
	
	
G	[FeCl ₃]= 2 mM bfrB::E2orange (5%) pvdA::DsRedexpress2 (95%)	

Table 1 :Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristic	Source or reference
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> (Str ^R) Δ <i>lacX74</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15 araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) λ ;	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 Tet ^r F' <i>[proAB lac^RZ</i> Δ <i>M15 Tn10</i> (Tet ^r Amy Cm ^R);	Stratagene
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild type	ATCC 15692
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>DpvdA</i>	Pyoverdine-deficient mutant	Ochsner et al. (2002)
<i>P. putida</i> KT2440	Wild type	DSMZ
<i>S. oneidensis</i> MR1	Wild type	ATCC 70050
Plasmids^a		
pPROBE'-GFP[LVA]	Broad host-range promoter probe vector; Km ^r	Miller et al. (2000)
pPROBE-NT'	Broad host-range <i>gfp</i> promoter probe vector ; Km ^r	Miller et al. (2000)
pJBA28	Source of <i>P</i> _{A11/04/03} promoter; Ap ^r ; Km ^r	Andersen et al. (1998)
pPROBE-NT' <i>lac</i>	pPROBE-NT' derivative with <i>gfp</i> driven by <i>P</i> _{A11/04/03} ; Km ^r	This study
pmCherry	Source of mCherry coding sequence; Ap ^r	Clontech
pBAD-mTagBFP2	Source of mTagBFP2 coding sequence; Ap ^r	Subach et al. (2011)
pcDNA3-mOrange2	Source of mOrange2 coding sequence; Ap ^r	Shaner et al. (2008)
pE2-Orange-N1	Source of E2-Orange coding sequence; Km ^r	Strack et al. (2009)
pE2-Red/Green-N1	Source of E2-Red/Green coding sequence; Km ^r	Strack et al. (2009)
pcDNA3.1-Clover-mRuby2	Source of Clover and mRuby2 coding sequences; Ap ^r	Lam et al. (2012)
pcDNA3-mNeptune2.5	Source of mNeptune2.5 coding sequence; Ap ^r	Chu et al. (2014)
pNCS-mCardinal2	Source of mCardinal2 coding sequence; Ap ^r	Chu et al. (2014)
pPBC495	Promoter probe plasmid carrying <i>E. coli</i> codon optimized <i>EcFbFP</i> ; Km ^r	This study
pPBY538	Promoter probe plasmid carrying <i>E. coli</i> codon optimized <i>TurboYFP</i> ; Km ^r	This study
pPBO561	Promoter probe plasmid carrying <i>E2-orange</i> ; Km ^r	This study
pPBO565	Promoter probe plasmid carrying <i>mOrange2</i> ; Km ^r	This study
pPBRG585	Promoter probe plasmid carrying <i>E2-Red/Green</i> ; Km ^r	This study
pPBR591	Promoter probe plasmid carrying <i>E. coli</i> codon optimized <i>DsRed-Express2</i> ; Km ^r	This study
pPBR610	Promoter probe plasmid carrying <i>mCherry</i> ; Km ^r	This study
pPBF646	Promoter probe plasmid carrying <i>E. coli</i> codon optimized <i>E2-Crimson</i> ; Km ^r	This study
pPB-lac-B454	pPBB456 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mTagBFP2</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-F495	pPBF495 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>EcFbFP</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-G515	pPBG515 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mClover</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-Y538	pPBY538 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>TurboYFP</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-O561	pPBO561 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>E2-orange</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-O565	pPBO565 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mOrange2</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-RG585	pPBRG585 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>E2-Red/Green</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-R591	pPBR591 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>DsRed-Express2</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-R600	pPBR600 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mRuby2</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-R610	pPBR610 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mCherry</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-F643	pPBR643 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mNeptune2.5</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-F646	pPBR646 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>E2-Crimson</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-F659	pPBR659 carrying a <i>P</i> _{A11/04/03} - <i>mCardinal2</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-bfrB-O561	pPBO561 carrying a <i>bfrB-E2Orange</i> fusion; Km ^r	This study

pPB-pvdA-R591	pPBR591 carrying a <i>pvdA-DsRed-Express2</i> fusion; Km ^r	This study
----------------------	---	------------

^a Individual plasmid names in the set of pPB vectors have the form pPBXyyy, where X and yyy denote the spectral class and the fluorescence emission maximum (in nm) of the encoded FP, respectively.

References

1. Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2240–2246.
2. Chu J, Haynes RD, Corbel SY, Li P, González-González E, Burg JS, Ataie NJ, Lam AJ, Cranfill PJ, Baird MA, Davidson MW, Ng HL, Garcia KC, Contag CH, Shen K, Blau HM, Lin MZ. 2014. Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein. *Nat Methods* 11:572–578
3. Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY, Lin MZ. 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9, 1005–1012
4. Lutz R, Bujard H. 1997. Independent and Tight Regulation of Transcriptional Units in *Escherichia coli* Via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 Regulatory Elements. *Nucleic Acids Res.* 25:1203–1210.
5. Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE. 2000. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 13:1243–1250.
6. Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil ML. 2002. GeneChip® expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 45 :1277–1287.
7. Rochat L, Pechy-Tarr M, Baehler E, Maurhofer M, Keel C. 2010. Combination of fluorescent reporters for simultaneous monitoring of root colonization and antifungal gene expression by a biocontrol pseudomonad on cereals with flow cytometry. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 23:949–961
8. Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY. 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5:545–551.
9. Strack RL, Bhattacharyya D, Glick BS, Keenan RJ. 2009. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of *DsRed-Express2* for whole-cell labeling. *BMC Biotechnol.* 9.

Chapitre 2 : Altération bactérienne des nontronites : Cristallochimie versus biochimie

Cette partie présente la mise en application directe de la méthode de biosensing développée précédemment à l'une des problématiques majeures de la biogéochimie : l'identification des facteurs clés déterminant les processus de bio-altération des minéraux dans les sols ou la disponibilité d'oligo-éléments comme le fer.

Il est reconnu aujourd'hui, que les activités chimiques des micro-organismes (bactéries et champignons) au travers de la production et de l'excrétion de divers métabolites (*e.g.* protons, sidérophores, quinones, acides organiques...) sont déterminantes dans le processus global d'altération minérale (Alexander 1977 ; Powell *et al.* 1980 ; Berthelin 1983 ; Barker *et al.* 1998 ; Ehrlich 1996 & 1997 ; Leyval *et al.* 1990 ; Gadd 2007 ; Ferret *et al.* 2014).

Cette bio-altération minérale, notamment celle induite par l'activité des microorganismes continentaux (bactéries et champignons) a joué et continue de jouer un rôle fondamental dans le processus d'évolution de la surface de la Terre. En modifiant la disponibilité des éléments chimiques, qui peuvent être à la fois bénéfiques ou délétères pour les organismes vivants, ce processus impacte de façon durable la qualité de l'eau et la fertilité des sols et donc à plus large échelle sur le fonctionnement des écosystèmes terrestres et de leur biodiversité. L'importance de la bio-altération microbienne sur la formation et le fonctionnement des sols ou la nutrition végétale a commencé à être formellement décrite depuis un demi-siècle et observée dans de nombreuses zones climatiques et géographiques. Les fondements théoriques concernant la compréhension et les moyens d'investigations des relations entre la biodiversité d'un sol et les transformations minérales qui s'y déroulent ont été apportés par Vassili Dokoutchaïev. Ce géographe russe considéré comme le père de la pédologie, fut l'un des premiers scientifiques à considérer la matière vivante comme un facteur clé de la pédogénèse. Dans son sillage, Vladimir Vernadski, minéralogiste et chimiste russe, définit le terme « biosphère » et pose l'hypothèse qu'« *il n'existe aucune force chimique à la surface de la Terre plus permanente, et par conséquent, ayant de plus grand impact sur sa transformation que les organismes vivants* ». Avec son homologue suisse, Victor Goldschmidt, ils seront à l'origine de l'émergence de nouveaux champs d'étude transdisciplinaires comme la géochimie et plus tard, la biogéochimie.

De nombreux protocoles expérimentaux ont été développés et utilisés pour étudier en laboratoire, les interactions bactérie-minéraux et les mécanismes impliqués. Ils reposent, en général, sur la quantification des flux d'éléments majeurs (K, Mg, Ca, Fe,...) ou en traces (Cu, Zn, Ni, Co...) générés lors de la lixiviation de minéraux, roches ou sols par des souches bactériennes, et l'identification des cinétiques d'altération microbiennes à partir de minéraux modèles d'origine naturelle ou synthétisés représentant les principales familles minéralogiques (phosphates, oxi-hydroxydes, silicates, sulfures...) (Kalinowski and Schweda 1996 ; Welch and Ulman 1999 ; Kalinowski *et al.* 2000 ; Balland *et al.* 2010). Ces dissolutions bactériennes expérimentales de minéraux visent, avant tout, à déterminer l'impact des activités microbiennes

sur les cinétiques et les rendements de dissolution des silicates en identifiant les processus principaux, sans véritablement se soucier du bénéfice que retire l'agent d'altération principal, i.e. la bactérie, de tels processus. Des études sont aussi menées pour identifier des traceurs isotopiques discriminatifs des processus d'altération biochimiques de ceux strictement chimiques. Le but ultime de ces recherches est d'établir à la fois des voies et des bilans d'altération utilisables pour modéliser le fonctionnement des écosystèmes continentaux (Welch & Ulman 1993). Dans ces approches géochimiques et isotopiques, la bactérie est considérée comme un simple catalyseur de réactions chimiques impliquées dans l'altération des minéraux.

D'autres études plus biochimiques privilégient la caractérisation des métabolites excrétés et d'exopolymères produits par les bactéries ou la spécificité de la colonisation des surfaces minérales par les cellules microbiennes (Golubev et al. 2006 ; Welch et al. 1999 & 1994). Par exemple, les voies métaboliques de la production spécifiques de sidérophores lors de carence en fer ou assurant l'excrétion de peroxydases chez les microorganismes sont largement documentées (Meyer et al. 1978 & 2008 ; Heinrichs et al. 1993 & 1996). En revanche, ces recherches oublient souvent l'importance des propriétés minéralogiques et de la diversité des formes minérales dans l'interprétation de leurs résultats.

Ainsi, s'il est reconnu que ce sont les activités chimiques des organismes au travers de la production et de l'excrétion de divers métabolites (*e.g.* sidérophores, acides organiques) qui prévalent dans le processus global d'altération minérale, on connaît encore très peu de choses sur les interactions moléculaires entre les surfaces minérales et les métabolites. De même, la variabilité qualitative et quantitative des processus bactériens de lixiviation ou des stratégies d'altération en fonction de différents paramètres expérimentaux comme le taux d'adhésion, les sources d'énergie, la production de métabolites spécifiques, ou la texture (composition et structure) des minéraux employés est encore à explorer.

C'est pour répondre à ce type de questions, que des expériences s'inspirant de l'approche méthodologique SFS/CP énoncée au Chapitre I de ce travail ont été réalisées avec des minéraux naturels purifiés et calibrés et des souches de références génétiquement ingénierées. Les systèmes minéral-bactérie choisis sont composés de deux types de phyllosilicates 2:1 riche en fer (III), la nontronite N_{Au-1} et la nontronite N_{Au-2}, et d'une bactérie dont le genre est ubiquitaire des sols: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Comme il a été mentionné dans le chapitre « Matériels et méthodes », l'intérêt de ces deux minéraux réside dans leur cristallogénie respective : ils possèdent tous deux une structure géométrique identique tandis que leur composition chimique varie en proportion. Les formules structurales des nontronites N_{Au-1} et N_{Au-2} sont les suivantes :

- N_{Au-1} : (Si_{6.98}Al_{0.95}- Fe_{0.07})(Al_{0.36}Fe_{3.61}Mg_{0.04})O₂₀(OH)₄Na_{1.05}
- N_{Au-2} : (Si_{7.55}Al_{0.16}Fe_{0.29}) (Al_{0.34}Fe_{3.54} Mg_{0.05})O₂₀(OH)₄Na_{0.72}

La différence notable entre ces deux nontronites est la proportion de fer se trouvant dans les feuillets à configuration tétraédriques. 0,02 g de fer par gramme de nontronite pour N_{Au-2} contre 0,005 g pour N_{Au-1} soit respectivement 8 et 2% du fer total. Ainsi, l'utilisation de ces nontronites dans des expériences multiparamétriques permet d'étudier l'impact généré par de légères variations cristallogéniques sur la réactivité des minéraux.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* apparaissent comme l'un des taxons les plus importants des sols. Elles interviennent comme agents de bio-contrôle (*e.g.* suppression d'agents pathogènes pour les plantes, dégradation de xénobiotiques) et sont connues pour promouvoir la croissance végétale. Elles possèdent une importante capacité d'adaptation, notamment au travers de leur capacité à mobiliser le fer présent dans leur environnement. Elles ont développé entre autre un système d'acquisition du fer basé sur la production et l'excrétion de molécules à

fort pouvoir chélateur, les sidérophores. Les sidérophores sont reconnus pour promouvoir l'altération minérale mais leur mécanisme d'action reste encore à être précisé. La souche *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 est l'une des souches modèles la mieux caractérisée à ce jour. Au travers de l'utilisation de souches mutées sur la production de l'un ou l'autre de ses sidérophores, il est possible d'étudier en détails le rôle joué par les sidérophores dans les processus d'altération minérale. De plus, le génome de la souche PAO1 est bien décrit et permet de construire des biosenseurs fluorescents *ad hoc*.

Ainsi, l'étude de systèmes PAO1/NAu-1/NAu-2 au sein d'expériences multiparamétriques inspirées de la méthode décrite au chapitre précédent nous a fourni les outils nécessaires à l'étude des problématiques liées à la texture des minéraux et à l'action de métabolites bactériens dans les processus d'altération.

1. Fer, métaux et métabolisme microbien

Les roches et les minéraux représentent un vaste réservoir d'éléments chimiques essentiels pour les êtres vivants. Outre les éléments essentiels tels que le soufre ou le phosphore, la majorité des minéraux contient des métaux de transition. Par exemple, le fer(II) ou le fer(III) sont des composés mineurs ou majeurs de plus de 200 minéraux qu'ils s'agissent de silicates (*e.g.* olivine, micas noirs, serpentine, smectite), de phosphates, sulfates ou carbonates (vivianite, jarosite, sidérite, chukanovite...) et bien sûr d'oxydes ou oxy-hydroxydes oxydes (*e.g.* hématite, magnétite, lépidocrocite, goëthite...) (Figure 28).



Figure 28: (A) Jarosite : sulfate de fer(III) $XFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ avec $X=H_3O^+, NH_4^+, K^+, Ag^+$, (B) Hématite , oxyde de fer $Fe_2O_3 + nH_2O$, (C) Nontronite , phyllosilicate dioctaédrique $Na_{0.3}Fe^{3+}_2Si_3AlO_{10}(OH)_2 \cdot 4(H_2O)$.

Le fer et d'autres éléments métalliques interviennent directement ou indirectement dans le métabolisme microbien. En tant que co-facteurs enzymatiques, ils sont essentiels pour des processus métaboliques cruciaux. Environ la moitié des protéines connues possèdent un ou plusieurs sites de fixation d'ions métalliques qui assurent une fonction catalytique ou structurale. Parmi les métalloprotéines remarquables, on peut citer les ADN-polymérases (Magnésium), les nitrogénases (Molybdène/Fer, Vanadium/Fer ou Fer uniquement), les cytochromes (Fer) / cytochrome oxydase (Fer/Cuivre), les superoxyde dismutases (Fer, Cuivre/Zinc, Manganèse, Nickel), les protéines Fer-Soufre, la monoxyde de carbone déshydrogénase (Molybdène chez les aérobies, Nickel chez les anaérobies), la formiate déshydrogénase NADP⁺ (Tungstène, Sélénium, Fer) ou encore les ribozymes (Figure 29).

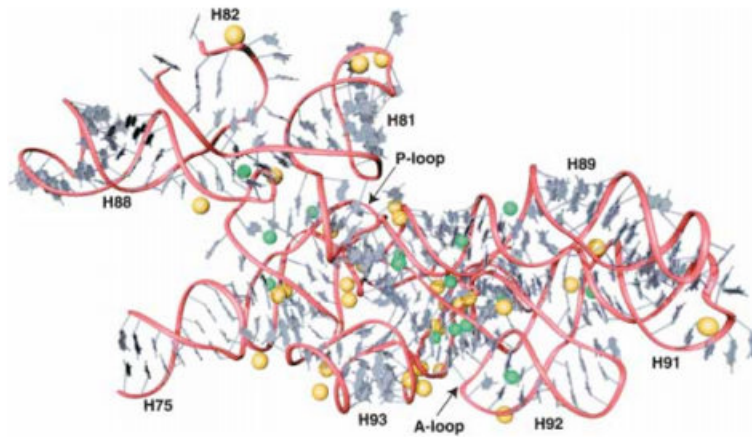


Figure 29 : Représentation 3D du centre peptidyl transférase de l'ARNr 23S, sous-unité ribosomique la plus conservée au travers des trois domaines du vivant, montrant l'impressionnante densité d'ions Mg^{2+} (jaune), Na^+ et K^+ (vert) stabilisant sa structure. La matrice ARN est représentée en rouge avec en gris les nucléotides correspondants (Klein et al. 2004).

De plus, de nombreuses bactéries sont capables d'utiliser certains ions ou oxy-anions de métaux (Fe, Mn...) ou métalloïdes (As, Sb...) comme accepteurs ou donneurs d'électrons dans leur métabolisme énergétique. C'est le cas pour les bactéries *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Leptospirillum ferrooxidans* et les archées *Acidianus brierleyi* et *Sulfolobus acidocaldarius* qui tirent leur énergie de l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) (Ehrlich 1996 & 1997) (Figure 30). *Stibiobacter senarmontii* et *Pseudomonas arsenitoxidans* sont d'autres exemples de bactéries récupérant leur énergie à partir de l'oxydation de métalloïdes toxiques comme l'antimoine et l'arsenic en utilisant respectivement les couples redox Sb_2O_3/Sb_2O_5 ou AsO_2^-/AsO_4^{3-} (Lialikova et al. 1975 ; Ilyaletdinov & Abrashitova 1981). D'autres espèces bactériennes sont, en revanche, capables d'utiliser certains métaux ou métalloïdes comme accepteurs finaux d'électrons dans leur respiration anaérobie. C'est le cas de l'espèce bactérienne *Geobacter metallireducens* réduisant le Fe^{3+} en Fe^{2+} , Fe_3O_4 ou $FeCO_3$ (Lovley & Phillips 1988 ; Coleman et al. 1993), ou le MnO_2 en Mn^{2+} ou $MnCO_3$ en présence d'acétate comme source de carbone (Lovely & Phillips 1988). Ce mécanisme a également été observé lors d'une respiration aérobie avec *Pseudomonas fluorescens* qui est capable d'intégrer la réduction du CrO_4^{2-} en Cr^{3+} à sa chaîne respiratoire (Ehrlich 1996 ; Wang & Shen 1995).

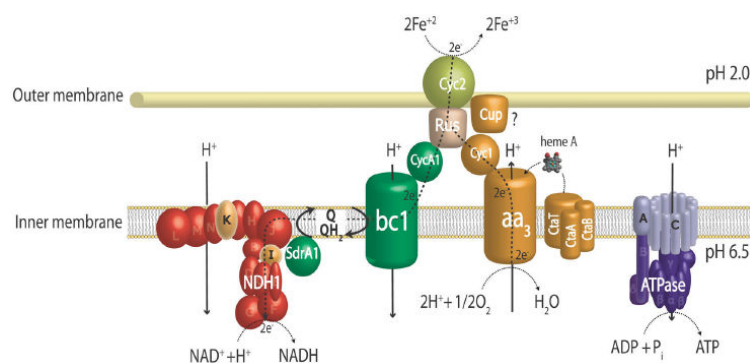


Figure 30 : Représentation de l'oxydation du Fe(II) par *A. ferrooxidans* ATCC 23270. La réduction de l' O_2 via le complexe aa3 ou la réduction du NAD^+ via un ensemble de quinone et un complexe NADH. La première voie consomme les protons entrant via le complexe ATPase qui entraîne la production d'ATP tandis que la seconde conduit à la production du NADH (Quatrini et al. 2009).

2. Rôle des métabolites acides et des sidérophores dans l'altération minérale

Les microorganismes ont développé différentes stratégies afin d'extraire ces métaux des substrats minéraux via des processus d'oxydo-réduction ou d'acidification ou de complexation. Ils accélèrent les réactions d'altération des minéraux en modifiant les conditions redox du milieu, en excréant des métabolites (e.g. acides organique) ou en produisant des exopolymères plus ou moins hydrophiles à la surface du minéral (formés).

La dissolution des minéraux est contrôlée par l'adsorption de protons ou d'hydroxyles, de ligands en solution polarisant et affaiblissant les liaisons oxygène-métal à la surface du minéral. Si le métal est réductible, l'apport d'électrons modifie son rayon ionique et fragilise la liaison métal-oxygène. (Furrer & Stumm 1986 ; Helgeson et al. 1984 ; Malmström et al. 1996)

Le processus de biolixiviation des métaux ou de dissolution des minéraux est décomposable en trois étapes principales :

- le transport des bioréactants (réactifs d'origine) vers l'interface minéral/solution par convection, diffusion, migration ou contact direct particule/cellule ;
- la réaction à la surface du minéral proprement dite qui inclut l'adsorption des réactifs sur les sites actifs accessibles, la solubilisation des métaux et leur désorption ;
- le transport en solution des métaux hors de l'interface solide/liquide.

Même si en première approximation, le processus de dissolution est limité par les quantités de bioréactants produits par les bactéries ou de surfaces minérales réactives accessibles, c'est la diffusion ou l'advection des bioréactifs (e.g. sidérophores) et solutés qui contrôlent la première et la troisième étape. En revanche, la texture des particules minérales employées, c'est à dire leur composition, leur taille, leur forme, sont déterminantes pour la seconde étape.

De même sur cette seconde étape, la présence d'un biofilm peut avoir des effets opposés. D'un côté, sa présence améliore le taux d'altération en augmentant le temps de résidence des réactifs au voisinage des surfaces minérales (Barker et al. 1998). De l'autre côté, les polysaccharides qui le composent, se lient irréversiblement aux sites réactifs de surface des minéraux en formant des complexes métalliques polynucléaires et inhibent le processus d'altération (Golubev et al. 2006 ; Welch et al. 1999 ; Barker et al. 1998 ; Welch & Vandevivere 1994).

2.1. Les agents d'oxydo-réduction

L'un des systèmes les mieux étudié est celui de la dissolution de Fe(II) par réduction d'oxydes de Fe(III) (Figure 31). Des travaux à la fin des années 90 sur des espèces bactériennes modèles du genre *Shewanella* et *Geobacter* ont montré que le transfert des électrons nécessaires à la réduction peut s'effectuer par contact direct entre la cellule et la surface du minéral (Myers & Myers 1992 & 1997 ; Beliaev et al. 2001 ; Gaspard et al. 1998 ; Lovley 2000 ; Luu & Ramsay 2003). Les protéines impliquées dans ces transferts diffèrent d'une espèce à l'autre, mais le mécanisme global est le suivant : à partir d'une déshydrogénase située au niveau de la membrane cytoplasmique, les électrons sont transférés à un ensemble de quinones (ubiquinones et menaquinones) puis au sein d'un réseau de cytochromes C et enfin à une réductase située sur la membrane externe (Newman & Kolter 2000 ; Lovley 1993 ; Myers & Myers 1993 & 2004 ; Saffarini et al. 2002 ; Shi et al. 2007). Bien que ces mécanismes de transferts d'électrons ont été largement précisés, l'étude des génomes séquencés de *Shewanella* et *Geobacter* a révélé l'existence d'une multitude de cytochromes C inconnus, laissant entrevoir des possibilités de variations importantes dans les chaînes métaboliques impliquées dans le transport d'électrons (Weber et al. 2006). A titre d'exemple, 39 cytochromes C ont été identifiés chez *S. oneidensis* et 111 chez *G. sulfurreducens* (Heidelberg et al. 2002 ; Methe et al. 2003).

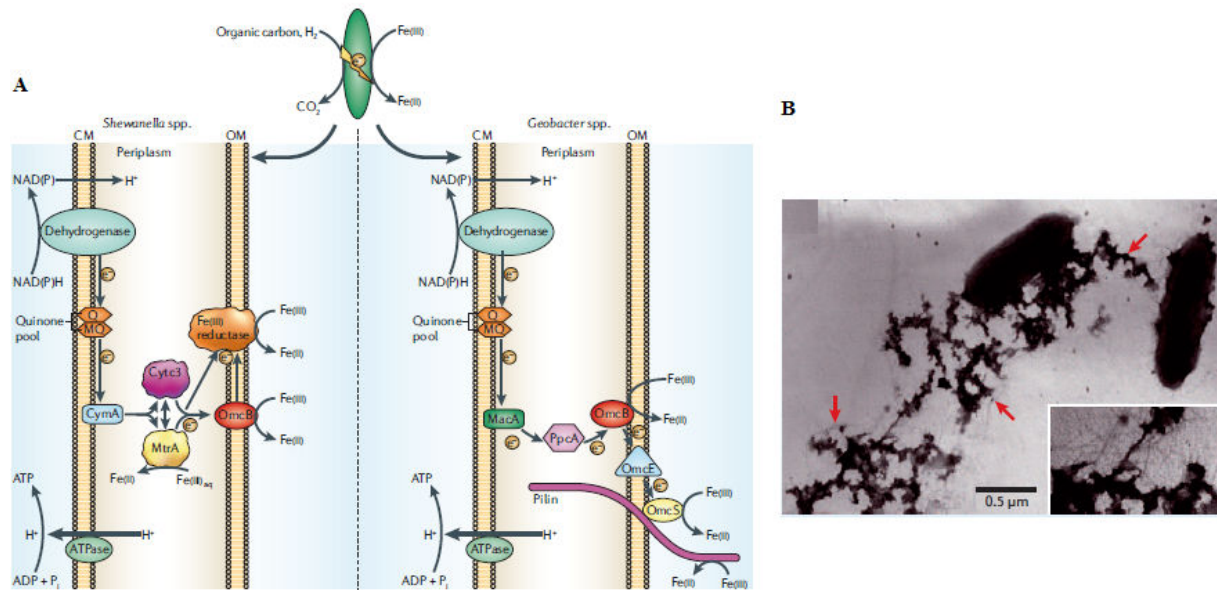


Figure 31 : (A) Représentation schématique décrivant le mécanisme de transport d'électrons vers le milieu extracellulaire chez *Shewanella* et *Geobacter*. (B) Observation au microscope électronique à transmission d'oxydes de Fe(III) (indiqués par des flèches rouge) en contact avec des pili produits par *Geobacter sulfurreducens* (Weber et al. 2006 ; Lovley 2006).

D'autres mécanismes impliqués dans le transfert direct ou indirect d'électrons existent ou co-existent avec ce système respiratoire pariétal.

Par exemple, *Geobacter* est capable de développer des pili unilatéraux (*i.e.* dirigés de manière spécifique) hautement conducteurs assurant le transfert direct d'électrons de la surface membranaire vers les particules d'oxydes de Fe(III) (Reguera et al. 2005) (figure 5). Les propriétés conductrices de ces nano-fils biologiques et le mécanisme moléculaire impliqué dans le transfert des électrons restent à être clairement élucidés. Depuis, des structures équivalentes aux pili conducteurs de *G. sulfurreducens* ont été observées chez d'autres souches bactériennes appartenant à d'autres genres tels que *Shewanella oneidensis*, *Synechocystis* PCC6803 ou *Pelotomaculum thermopropionicum* (Gorby et al. 2006).

La souche bactérienne *Geobacter metallireducens* et d'autres ferri-réductrices utilisent des transporteurs d'électrons extracellulaires comme les dérivés de quinones pour transférer les électrons et réduire à distance les oxydes de fer (Lovley et al. 1996). Ces molécules sont particulièrement stables et peu dégradables et leur état d'oxydation est réversible : elles passent sans dommage d'une forme réduite (hydroquinone ou catéchol) à une forme oxydée (quinone) et vice versa. C'est ainsi que certains auteurs ont formulés l'hypothèse que dans les sols et les sédiments, les substances organiques naturelles à fort degré d'aromaticité comme certains composés humiques (riches en groupements phénoliques, carboxyliques et quinoïques) pourraient servir de navettes électroniques, assurant le transfert des électrons de manière abiotique au Fe(III) (Figure 32). Ces molécules complexes issues de la dégradation des plantes, des animaux ou encore des microorganismes sont des composés acides, majoritairement aromatiques, hydrophiles possédant des propriétés semblables aux polyélectrolytes (polymère ionique). Des mesures en résonance de spin électronique ont corrélé directement la capacité des substances humiques à accepter des électrons avec le nombre de groupes quinone présent dans leur structure (Scott et al. 1998). Selon les connaissances actuelles, tout microorganisme capable d'utiliser les substances humiques comme accepteur d'électrons, peut réduire le Fe(III).

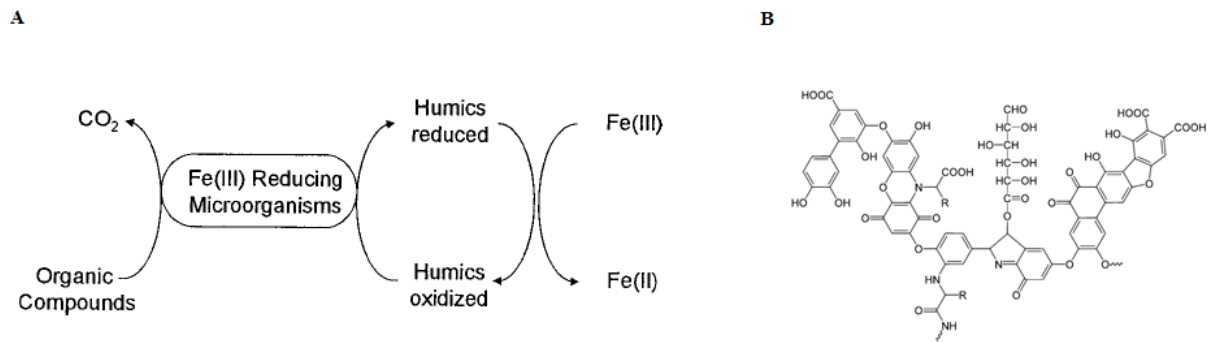


Figure 32 : (A) Modèle de réduction des oxydes de Fe(III) via l'utilisation de substances humiques comme transporteurs d'électrons. (B) Un exemple d'acide humique (Luu & Ramsay 2003).

2.2. Les bioréactifs acido-complexants

De nombreux travaux de recherche ont été consacrés à l'étude de l'effet catalytique des acides carboxyliques sur la dissolution des oxydes et des silicates (Balland et al. 2010 ; Cama & Ganor 2006 ; Furrer & Stumm 1986). Les microorganismes et les plantes produisent divers composés acides et ligands organiques qui peuvent influencer sur l'altération des minéraux dans les sols. (Berthelin 1983 ; Calvaruso et al. 2006 ; Robert & Berthelin 1986 ; Ullman et al. 1996 ; Welch & Ullman 1999a). Leur concentration varie en fonction de l'environnement, et le type de sol, et sont en moyenne de l'ordre de 10^{-3} M (Drever & Stillings 1997). L'action des acides et ligands organiques est double : (i) en se fixant sur les surfaces minérales les protons mobilisent les éléments et (ii) les ligands en complexant les éléments en solution déplacent les équilibres solide/solution et accélèrent indirectement le taux de dissolution des minéraux. La vitesse globale de dissolution en présence de ligands acides est donc la somme de deux réactions de surface dépendante : l'acidolyse (proton-promoted dissolution) et la complexolyse (ligand-promoted dissolution). L'acidolyse prédomine à pH acide (1-4) et la complexolyse prédomine à pH neutre lorsque l'effet des protons est minimal (Welch & Ullman 1999).

Les phyllosilicates peuvent être altérés par voie acide ou basique. Deux types de liaisons sont mis en jeu suivant l'une ou l'autre de ces voies : dans un environnement acide, le mécanisme d'altération se porte sur les liaisons Fe-O (ou Al-O), dans un environnement basique, sur les liaisons Si-O. La vitesse de dissolution augmente de manière exponentielle dans les zones de pH allant de 5 à 1 et 8 à 14. Elle est minimale dans la gamme centrale de pH ; pH mesuré dans la plupart des sols étudiés. Des études comme celles portées sur les micas dioctaédriques et trioctaédriques ont permis de mettre en évidence l'impact des différences structurales au sein d'une même famille de minéraux sur les mécanismes d'altérations en milieu acide ($1 < \text{pH} < 4$) (Kalinowski & Schweda 1996). Les micas trioctaédriques présentent une surface particulièrement résistante aux attaques de protons comparativement aux micas dioctaédriques. Selon les auteurs, cette différence serait liée à la position (surface basale/latérale) et au nombre de sites actifs disponibles à la surface du minéral. L'étude des chlorites à pH acide a permis de révéler deux mécanismes de dissolution : l'un démontrant l'impact de la présence de défauts de surface qui favorisent la dissolution des surfaces basales et l'autre impliquant une rupture de la structure foliaire (transformation de feuillet TOTO' en feuillet TOT) (Brandt et al. 2003). Dans le cas des chlorites, le processus de dissolution s'effectue principalement au niveau des feuillets octaédriques (libération majeurs des éléments Mg, Al et Fe comparativement au silicium). Mais ces processus sont variables d'un phyllosilicate à l'autre. Il a, par exemple, été démontré dans le cas des nontronites que la dissolution acide impliquait conjointement la lixiviation du fer octaédrique à partir des surfaces basales et la dissolution du fer tétraédrique à partir des surfaces latérales (Grybos 2010). D'autres travaux encore montrent l'importance d'autres facteurs associés au pH qui peuvent intervenir dans la dissolution des minéraux tels que la température ou le temps de contact minéral/solution (Stillings et al. 1996 ; Welch & Ullman 1999).

Conjointement à la production d'acides carboniques induite par le catabolisme de composés carbonés ou lors du processus de respiration cellulaire, les microorganismes excrètent dans leur environnement des acides organiques tels que l'oxalate ou le citrate. Comme indiqué précédemment, ces molécules de faible poids moléculaire, en plus de leur caractère acidifiant, peuvent agir comme ligands se fixant à la surface du minéral et augmenter directement les rendements d'altérations par complexolyse (polarisation et affaiblissement des liaisons oxygène-métal entraînant la libération d'ions métalliques) ou comme complexants d'ions et favoriser indirectement les processus d'altération par déplacement de l'équilibre réactionnel (modification de l'état de saturation en ions et de leur spéciation). Cependant, en conditions naturelles, bien qu'un effet notoire ait été observé sur les aluminosilicates, leur effet sur l'altération de minéraux silicatés est à relativiser. En effet, une étude menée sur la smectite et l'impact de 9 ligands organiques (dont l'acétate, l'oxalate, le citrate et le gluconate) sur sa dissolution a démontré qu'il fallait atteindre des concentrations en ligands très élevées, de l'ordre de 10-100 mM, pour affecter de manière significative les rendements d'altération (Golubev et al. 2006). A titre de comparaison, la concentration en acides organiques dans un sol est de l'ordre du μM . Outre les acides organiques, les microorganismes excrètent aussi dans leur environnement des macromolécules telles que des polysaccharides. Ces molécules influencent de manière positive ou négative les processus d'altération des minéraux selon deux mécanismes : en favorisant la complexation des ions présents ou en inhibant de manière irréversible les sites réactifs présents à la surface du minéral (Welch & Vandevivere 1994 ; Backer et al. 1998 ; Welch & Ullman 2000). Lors de stress nutritif (*e.g.* carence en fer), les microorganismes excrètent aussi d'autres molécules plus spécifiques ayant un impact significatif sur l'altération minérale, *i.e.* les sidérophores. L'étude de ces molécules, dont la concentration dans les sols peut atteindre 10^{-3} M (Powell et al. 1980 ; Hersman et al. 1995), et de leur mécanisme d'action sont au cœur de ce travail de thèse et sont présentées plus en détails au cours de la section suivante.

Un modèle empirique et expérimental a été proposé pour ajuster le pH et les ligands à la vitesse de dissolution des minéraux silicatés (R_w) :

$$R_w = k_H (a_{H^+})^n + k_{OH} (a_{OH^-})^m + k_L (a_L)^l + K_0$$

où, a_{H^+} , a_{OH^-} , a_L , et k_H , k_{OH} et k_L désignent respectivement les activités des protons, hydroxydes et ligands, et les vitesses de réactions associées. n , m , et l correspondent à des ordres de réaction (constantes expérimentales).

Ce modèle empirique est maintenant utilisé dans la plupart des études réalisées sur l'altération des silicates et des oxydes, y compris pour des systèmes bactérie-minéral (Balland 2010 ; Grybos et al. 2011 ; Oulkadi 2013).

2.3. Des métabolites particuliers : les sidérophores

Parmi les divers éléments métalliques indispensables à nombre de processus métaboliques, le fer, au travers de ses propriétés électroniques versatiles, est probablement le plus important d'entre tous. Sauf quelques rares exceptions (*e.g.* les lactobacilles), toute forme de vie en est dépendante (Andrews et al. 2003). Cependant, en conditions aérobies et à pH neutre (*i.e.* condition physiologique), les ions ferreux s'oxydent rapidement en ions ferriques qui précipitent alors sous la forme d'oxy-hydroxydes polymériques hautement insolubles. Dans ces conditions, la concentration en fer libre dans les environnements terrestres et aqueux varie entre 10^{-9} et 10^{-17} M (Griffiths et al. 1999), sachant par exemple que les bactéries nécessitent une concentration en fer biodisponible d'approximativement 10^{-8} / 10^{-6} M (Guerinot 1994 ; Von Wandruszka 2006). De plus, il s'avère que le fer peut être extrêmement toxique en condition aérobie via la production de composés hautement réactifs par la réaction de Fenton (Touati 2000). Ainsi, afin de satisfaire leur besoin en fer tout en conservant une concentration de fer libre intracellulaire viable, *i.e.* de développer une homéostasie du fer efficace, les bactéries utilisent divers mécanismes plus ou moins sophistiqués selon les espèces. L'un des exemples les plus

démonstratifs concerne le genre *Pseudomonas*, qui possède une remarquable capacité d'adaptation.

D'une manière générale, les bactéries Gram négatives ont développé deux types de stratégies pour l'assimilation de fer depuis leur environnement : celle basée sur l'acquisition d'hème ou celle basée sur l'acquisition de complexes fer-sidérophore (Neumann & Römheld 2000 ; Kalinowski et al. 2000 ; Liermann et al. 2000 ; Uroz et al. 2007 ; Welch & Ullman 1999a). La Figure 33 résume ces deux mécanismes.

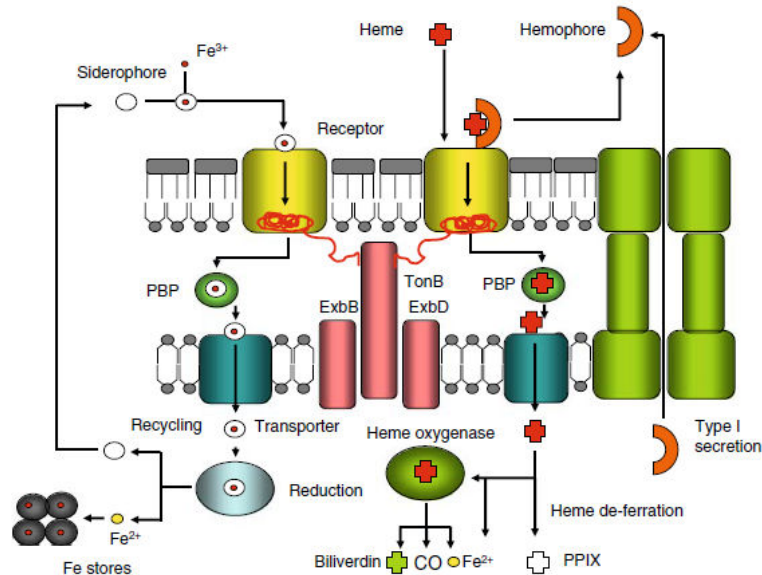


Figure 33 : Les différents systèmes d'acquisition du fer par les bactéries Gram-négatives (Cornelis 2010).

Dans les deux cas, un récepteur TonB-dépendant localisé au niveau de la membrane externe reconnaît le complexe ferreux. Ces récepteurs sont de larges porines dont l'extrémité Nter contient un domaine TonB interagissant avec la protéine TonB, localisée au niveau de la membrane interne, qui, conjointement avec les protéines ExbB et ExbD, transmet l'énergie induite par la force proton motrice afin d'ouvrir la porine et permettre le transport du complexe à travers l'espace périplasmique. Le fer est ensuite libéré du complexe par réduction non-destructive du Fe^{3+} en Fe^{2+} (laissant le chélateur intact) ou par destruction enzymatique via une estérase ou une hème oxygénase.

A ce jour, plus de 500 sidérophores structurellement distincts et de poids moléculaire variable (de 200 à 2000 Da) ont été identifiés (Boukhalfa & Crumbliss 2002). Bien que pouvant complexer différents métaux (Ag, Ni, Al, etc.), les sidérophores sont avant tout caractérisés par leur haute affinité au fer : de 10^{18} à 10^{52} M^{-1} . A titre de comparaison, c'est bien plus important que l'affinité des acides organiques présentés en amont tel que l'acide oxalique ($10^{7,5} \text{ M}^{-1}$). Selon les groupes fonctionnels impliqués dans la complexation du fer, on peut distinguer trois classes de sidérophores : les catécholates, les hydroxamates et les α -hydroxycarboxylates. Par leur capacité de chélation remarquable et une concentration dans les sols non-négligeable, les sidérophores favorisent de manière significative les processus d'altération minérale, notamment ceux qui se rapportent aux minéraux ferrifères (silicate, oxyde, sulfure.). Uroz et al (2009) en ont présenté quelques cas au travers des genres bactériens *Azotobacter* altérant la pyrite, la glauconite, l'olivine, la goethite, la limonite ou encore l'hématite et *Arthrobacter* / *Streptomyces* altérant l'hornblende. De même, certaines espèces du genre *Pseudomonas* sont connues pour altérer la goethite, l'hématite, la ferrihydrite, la kaolinite ou encore la smectite par l'intermédiaire de leur sidérophores.

Outre ces systèmes d'acquisition des hèmes utilisés principalement lors d'activité pathogénique, les bactéries du genre *Pseudomonas* (à l'exception de *P. putida* KT2440) peuvent utiliser deux types de sidérophores pour assimiler le fer nécessaire à leur développement (Cornelis & Matthijs 2002 ; Matthijs et al. 2007 & 2009 ; Mossialos & Amoutzias 2007). Le premier est commun à toutes les espèces *Pseudomonas* fluorescentes : la pyoverdine (Figure 34 A,B). La pyoverdine est une molécule complexe possédant une haute affinité pour le fer(III), de l'ordre de 10^{32} M^{-1} . Elle est composée d'un chromophore, généralement conservé d'une espèce à l'autre, d'une chaîne latérale acyle et d'une chaîne peptidique d'acides aminés D et L, de longueur et de composition variable, caractéristique de l'espèce. Le deuxième sidérophore est un sidérophore structurellement plus simple, possédant une affinité pour le fer nettement inférieure à celle de la pyoverdine, de l'ordre de 10^{18} M^{-1} : la pyochéline. D'un point de vue énergétique, sa synthèse est bien moins coûteuse que celle de la pyoverdine (9 gènes impliqués contre 31), offrant ainsi une certaine souplesse métabolique au genre (Ravel & Cornelis 2003 ; Moon et al. 2008). Enfin, de manière remarquable, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables d'utiliser une large gamme de xénosidérophores (sidérophores synthétisés par d'autres organismes, bactériens ou fongiques) en produisant de manière spécifique le récepteur TonB-dépendant nécessaire. Le nombre de ces récepteurs que peut produire un *Pseudomonas* varie d'une espèce à l'autre allant de 16 pour *P. syringae* à 42 pour *P. fluorescens* Pf5 (Cornelis & Bodilis 2009). *P. aeruginosa*, l'une des espèces *Pseudomonas* la mieux étudiée à ce jour, est capable d'utiliser, en plus des pyoverdines sécrétées par d'autres *Pseudomonas*, l'entérobactine (produite par *E.coli*), la cépabactine (produite par *Burkholderia cepacia*), le ferrichrome (produit par des champignons des genres *Aspergillus*, *Ustilago* et *Penicillium*) ou encore la deferrioxamine (produit par *Streptomyces pilosus*).

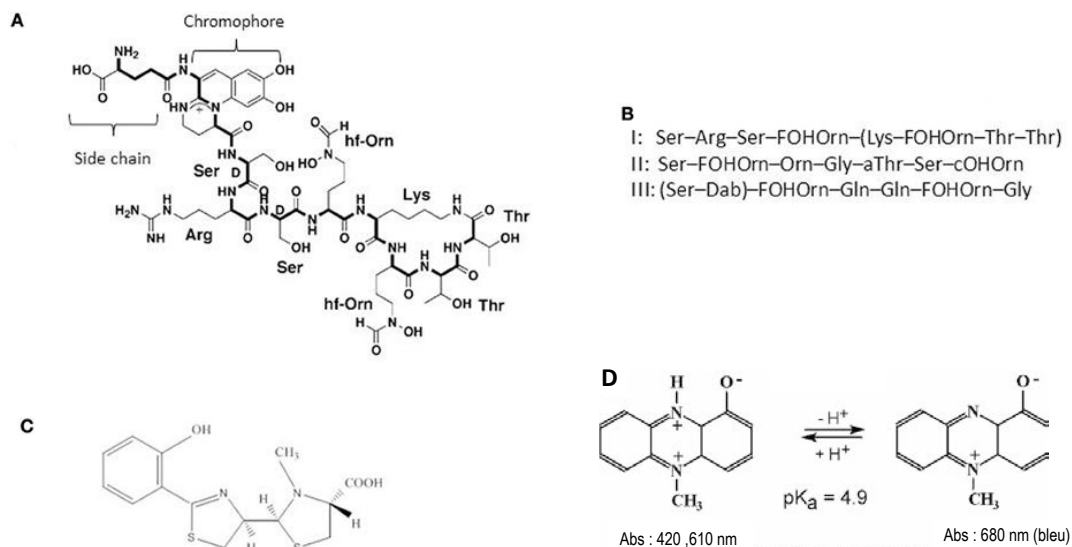


Figure 34 : Structures des sidérophores produits par *P. aeruginosa* : (A) structure de la pyoverdine de type 1 (B), séquences peptidiques des trois types de pyoverdine produite par *P. aeruginosa*. (C), structure de la pyochéline. (D) caractéristiques physico-chimiques de la pyocyanine, (Reszka et al. 2012)

3. Transformations minéralogiques bioinduites des nontronites au sein des GSH

D'après l'ensemble des résultats obtenus dans le travail de D. Oulkadi, sur l'altération des gels de silice hybrides GSH, il apparaît que les bactéries étudiées (*Shewanella oedinensis* MR1, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pantoea agglomerans* PA1, *Burkholderia* sp. G5, *Rahnella aquatilis* RA1) tolèrent assez bien ce matériau synthétique et « exotique » dans leur environnement. En effet, leur catabolisme carboné ne semble pas perturbé par la présence des

gels de silice (GSH): les profils et quantités d'acides organiques et de sidérophores produits par les bactéries demeurent inchangés (Oulkadi et al. 2014).

3.1. La dissolution réductrice des nontronites

La réduction microbienne du fer(III) contenu dans les GSH-NAu2 par *Shewanella odeinensis* (MR1) en condition d'hydrogénéotrophie a été expérimentée par L. Esnault (2010) afin de comprendre les processus d'altération des smectites ferrifères en milieu compacté profond (i.e. couches d'argiles consolidées). D'un point de vue fondamental, ces travaux ont mis en évidence un mécanisme de réduction à distance bio-induit via des médiateurs redox ou des transporteurs d'électrons (navettes), de type catéchols ou quinones, produits par les bactéries et diffusant dans les GSH (Figure 35). Aucun médiateur externe n'a été ajouté au milieu minéral employé pour réaliser les expériences.

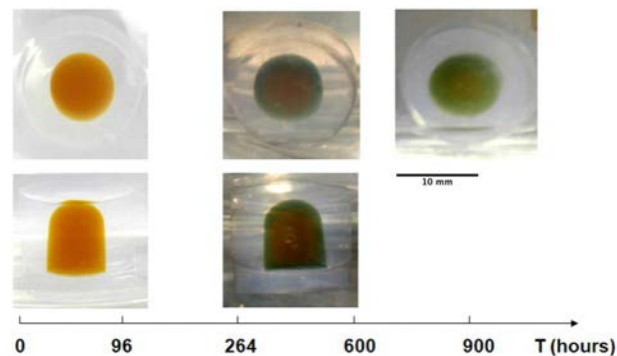


Figure 35 : Réduction du Fe(III) structurale de la nontronite NAu-2 dans un GSH « sandwich » par *S. odeinensis* MR1. La réduction a lieu à longue distance (distance >1mm), i.e. sans aucun contact direct entre les bactéries et les particules de nontronite NAu-2 piégées dans le gel de silice. Seules des molécules « navettes » de faible poids moléculaire peuvent diffuser dans la porosité (10-50 nm) du gel (D'après Esnault, 2010).

Durant le processus de réduction, les médiateurs réduits produits par la souche MR1 sont réoxydés au contact des atomes de fer (III) accessibles dans les sites octaédriques et tétraédriques des feuillets de phyllosilicates. La transparence optique des GSH permet de visualiser les transformations minéralogiques des particules de nontronite immobilisées au cours des incubations par un simple changement de couleur.

Le processus de réduction des nontronites immobilisées dans le GSH est marqué par la propagation d'un front de réduction caractéristique (orange → vert), correspondant à la réduction Fe(III)/Fe(II) (Figure 35). Cette perturbation des orbitales 3d du fer est quantifiable directement *in vitro* sur les GSH par spectrométrie UV-Vis entre 350 et 900nm. Comme le montre la Figure 36, il n'y a pas de bandes d'absorption spécifiques dans un gel de silice pur (GS), i.e. sans particules. Par conséquent, le spectre UV-Vis d'un gel de silice dopé en colloïdes permet de caractériser l'état du fer au sein des feuillets de nontronite inclus dans le gel.

Sur les gels de silice hybrides (GSH-NAu1), l'attribution des bandes d'absorption qui caractérisent dans ce domaine d'énergie, les transitions électroniques de l'orbitale 3d du fer dans les nontronites NAu-1 et NAu-2 est la suivante :

- Les bandes d'absorption intenses à 370-380 nm et la bande de plus faible intensité à 540-570 nm (visible uniquement pour NAu-2) correspondent aux transitions cristallines Fe(III) dans les octaèdres [${}^6A_{1g} \rightarrow {}^4T_2$].
- La bande à 450 nm bien marquée pour la nontronite NAu-1 correspond aux transitions électroniques entre atomes de fer d'octaèdres voisins [$2 \cdot {}^6A_{1g} \rightarrow 2 \cdot {}^4T_2$] (excitation par paires des sites *cis-* ou *trans-dihydroxyl* occupés par Fe(III))

- Enfin, les bandes situées à 525 nm et 650 nm, visibles uniquement dans la nontronite N_{Au}-2 sont caractéristiques respectivement des transitions cristallines Fe(III) [⁶A₁->⁴T₂] et [⁶A₁->⁴T₁] dans les tétraèdres.

Ces attributions sont basées sur les résultats de Sherman et Vergo en 1988 et de Merola et Mc Guire en 2009, établis sur des spectres UV-vis en réflexion diffuse obtenus sur des poudres de nontronite N_{Au}-1 et N_{Au}-2.

Ces auteurs ont aussi montré que la réduction du Fer(III) des nontronites par voie chimique en présence d'un réducteur puissant (dithionite Na₂S₂O₄) s'accompagne d'une diminution très nette de la bande à 370-380 nm et de l'apparition de bandes à 750 et vers 900 nm. Cette série de bandes marque l'apparition de transfert de charge Fe(II) -> Fe(III) sur des sites octaédriques voisins. Les autres bandes demeurent inchangées. Les fluctuations enregistrées entre 870 et 950 nm correspondent aux elongations OH des octaèdres.

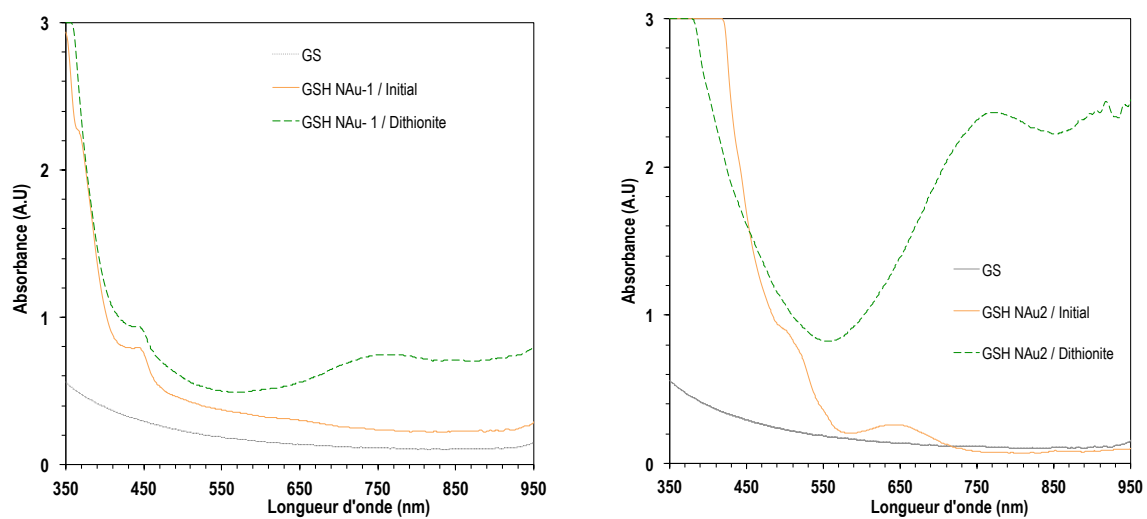


Figure 36 : Identification du statut du fer dans les feuillets de nontronite dispersés dans les gels de silice (GSH). Comparaison entre GSH-NAu1, GSH-NAu2 et des gels de silice purs (GS). (D'après Esnault 2010)

3.2. L'acido-complexolyse des nontronites

Pour des pH situés entre 4 et 8, la dissolution par acidolyse des nontronites est relativement limitée (Grybos et al. 2010). Dans ces conditions de pH proches de la neutralité, le processus d'altération est favorisé par la présence de ligands organiques agissant sur les nombreux doublets fer-fer présents dans les sites octaédriques voisins des nontronites.

La biodissolution des nontronites (N_{Au}-2) immobilisées au sein d'une matrice siliceuse a été étudiée avec 5 espèces bactériennes, *Burkholderia sp.* (U96936.1), *Burkholderia sp.* (EU184087.1), *Pseudomonas sp.* (AM933514.1), *Pantoea agglomerans* PA1 et *Rahnella aquatilis* RA1 (Grybos et al. 2011 ; Oulkadi et al. 2014). Pour l'ensemble de ces souches, à pH égal, la quantité totale de fer extraite des nontronites est supérieure à celle obtenue en conditions abiotiques par acidolyse (« proton-promoted » dissolution). Par exemple, pour les souches *Burkholderia sp.*, la quantité de fer extraite peut représenter jusqu'à douze fois la quantité extraite en condition abiotique. Ces résultats mettent en évidence la prévalence d'un processus de dissolution de type complexolyse (« ligand-promoted » dissolution) sur l'acidolyse, dont l'effet n'est pas pour autant négligeable. En effet, pour la souche *Pseudomonas sp.* (AM933514.1), la moitié du fer total extrait des nontronites (T1) est due à un mécanisme d'acidolyse. L'étude de la dissolution des nontronites par acidolyse en conditions abiotique a révélé que le rendement de dissolution était anti-corrélé à la taille des particules et à la quantité de sites réactifs présent à la surface du minéral. En revanche, en présence de bactéries, les rendements sont

indépendants de la taille des particules. Les auteurs en déduisent que les processus de complexolyse ne s'effectuent pas au niveau de sites de surface préférentiels.

Il est difficile de séparer les processus d'acidolyse et d'oxydoréduction. En effet, les doublets Fe-Fe s'avèrent plus sensibles à l'action des protons et des électrons que les doublets Fe-Al (Rozenson & Heller-Kallai 1976). Pour ces auteurs, l'action de réduction du Fe(III) sur un site octaédrique est renforcée par la protonation sur les groupements OH adjacents et l'action des protons peut entraîner à terme une déstabilisation de la liaison $\text{Fe}^{2+} - \text{OH}$, au sein de la couche octaédrique provoquant la déstructuration du feuillet.

Lors d'une expérience préliminaire, la souche *P.aeruginosa* PAO1 sauvage a été incubée à 37°C dans du milieu DCAA en présence de particules de nontronites NAu-2 en suspension colloïdale (T2, 1 g/l final) pendant 48h. A leur contact, contrairement à ce qui est observé lorsque les particules sont immobilisées au sein d'une matrice siliceuse, les bactéries forment un biofilm au sein duquel s'agrègent les particules et qui décante. A 24h un léger verdissement en surface du biofilm est observable (figure 3-3 A). Au cours du temps, ce verdissement gagne l'ensemble du biofilm (figure 3-3 B). A l'image des travaux réalisés par L. Esnault (2010) avec la souche *Shewanella odeinensis* (MR1), ce changement de couleur de la nontronite NAu-2 pourrait correspondre à une réduction du Fe(III) en Fe(II). Une analyse en lumière fluorescente confirme que cette couleur n'est pas due à une présence importante de pyoverdines (Figure 37C).

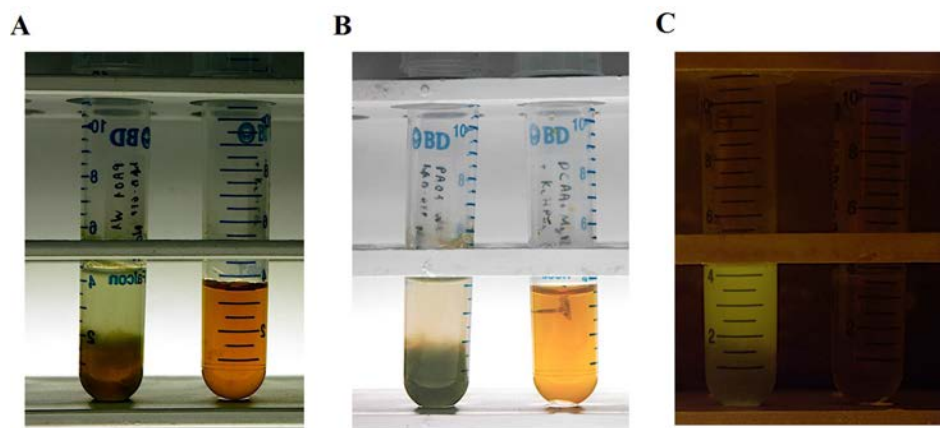


Figure 37 : Incubation 24h (A) et 48h (B) à 37°C de la souche PAO1_Wt dans du milieu DCAA en présence de particules de nontronites NAu-2 en suspension colloïdale (T2, 1 g/l final). C- Observation en lumière fluorescente (Excitation 480 SP /Emission 530 LP). Tube de droite dans chaque photographie : témoin stérile.

4. Expériences préliminaires : Interactions PAO1/Nontronite

4.1. Production d'acides organiques et de sidérophores en présence de gels dopés en nontronites

Des analyses réalisées au cours de ce travail en chromatographie ionique montrent que les profils et quantités d'acides organiques produits par les souches PAO1_Wt, PAO1_1Δ et PAO1_2Δ et connus pour avoir des propriétés altérantes (*e.g.* oxalate, citrate, etc.) demeurent similaires qu'elles soient en présence de gels dopés en nontronites NAu-1 ou en nontronites NAu-2 (Cf Article 3 à la fin de ce chapitre).

Au cours d'une expérience d'exploration, les trois souches PAO1 ont été incubées à 37°C pendant 48h dans du milieu DCAA selon trois conditions : en présence de gels de silices pures (GS, 1 gel pour 1 ml de milieu), de gels de silice dopés en Nontronite NAu-2 (GSH-NAu2) ou de gels de silice pures + 20 μM final de FeCl_3 . A terme, un gel de chaque condition pour les trois souches a été prélevé puis analysé en spectroscopie d'absorption ou synchrone.

Altération bactérienne des nontronites

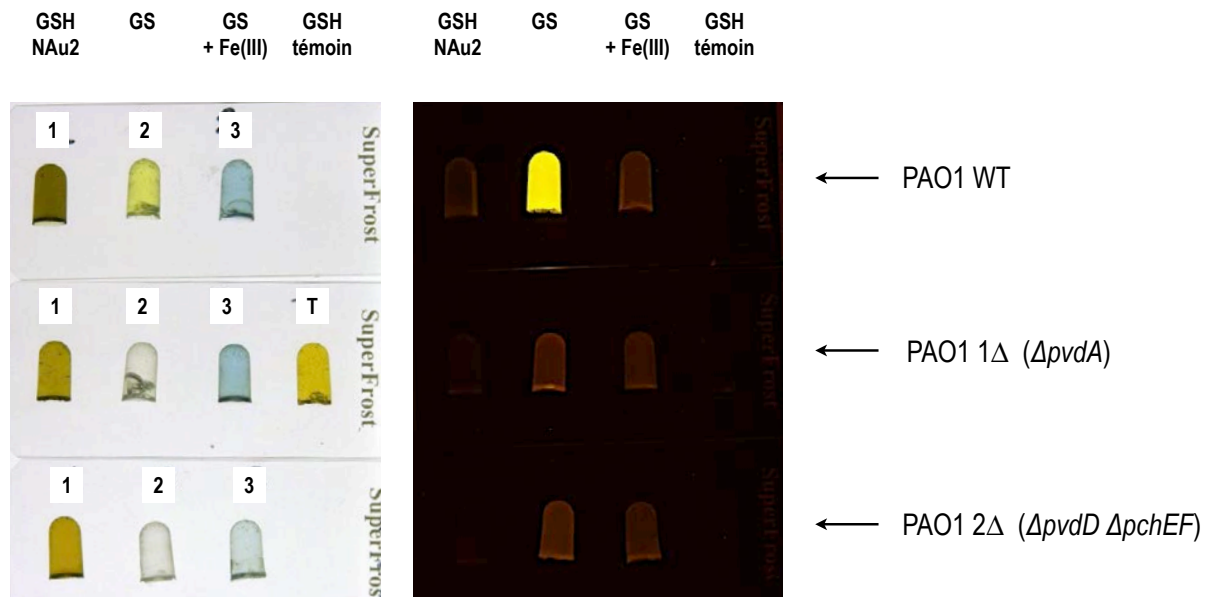


Figure 38 : Mise en évidence de la production de pigments par les différents mutants de souche PAO1 (Wt) dans différentes conditions expérimentales. De gauche à droite photographies en lumière naturelle et fluorescente (Excitation 480 SP /Emission 530 LP) de gels de silice dopés ou non en nontronite NAu-2 ou d'un soluté riche en fer (III) (20 μ M)

La Figure 38 présente chacun de ces gels observés en lumière naturelle ou fluorescente. On remarque dans un premier temps l'importante production de pyoverdine par la souche sauvage en condition de carence (GS) comparé aux deux autres conditions et parallèlement, l'absence de pyoverdine pour les souches mutées. Dans un second temps, on remarque nettement la production de pyocyanine (1-hydroxy-*N*-methylphenazine), pigment bleu amphotère possédant des propriétés oxydo-réductrices (Figure 34D), par les trois souches lorsqu'elles sont incubées en présence de Fe(III). Dans ces conditions les gels de silice « fixent » la pyocyanine. Le fer(III) adsorbé sur la matrice siliceuse sert de pont entre une silice chargée négativement et la pyocyanine déprotonée à pH 7-8. Les analyses spectrales en fluorescence et absorbance (Figure 39) réalisées sur les gels de silice confirment la production de pyoverdine (maxima d'absorbance à 405nm) et de pyocyanine (maxima d'absorbance à 680 nm). Les spectres des deux métabolites se mélangent à celui de la nontronite NAu-2. De la même façon, elles confirment l'absence de production de pyoverdine par les souches PAO1_1 Δ et 2 Δ . L'analyse en absorbance des milieux de culture révèle également une production de pyocyanine par les trois souches en présence des gels de silices dopés en nontronites NAu-2 ainsi qu'une production nettement inférieure en pyoverdine pour la souche sauvage, laissant supposer une biodisponibilité du fer présent au sein des nontronites.

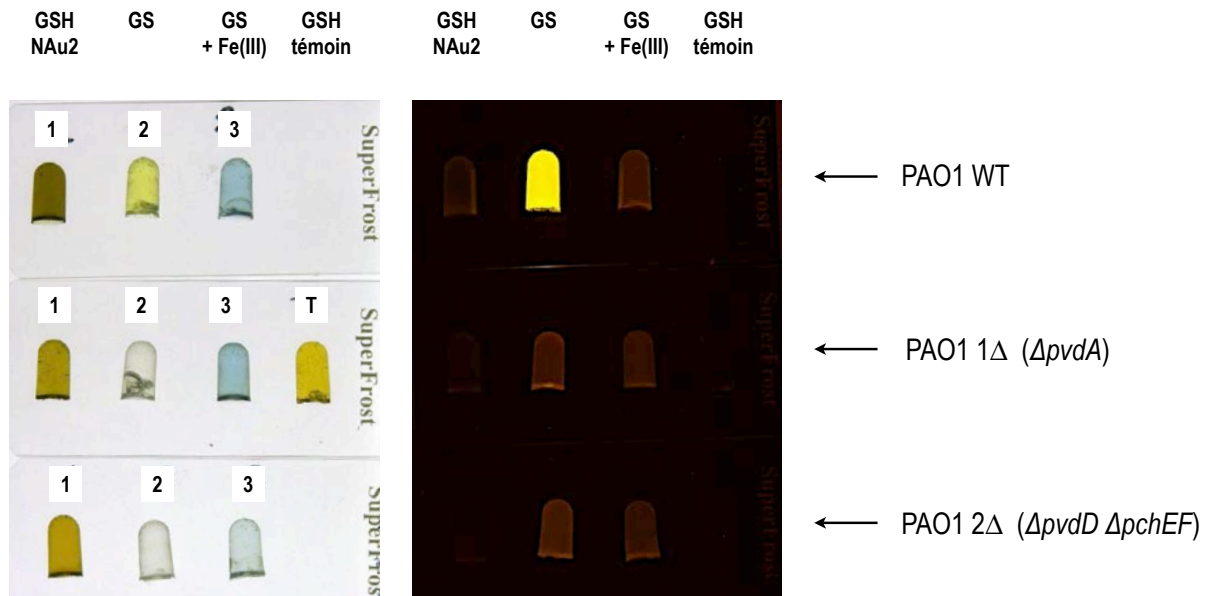


Figure 38 : Mise en évidence de la production de pigments par les différents mutants de souche PAO1 (Wt) dans différentes conditions expérimentales. De gauche à droite photographies en lumière naturelle et fluorescente (Excitation 480 SP /Emission 530 LP) de gels de silice dopés ou non en nontronite NAu-2 ou d'un soluté riche en fer (III) (20µM)

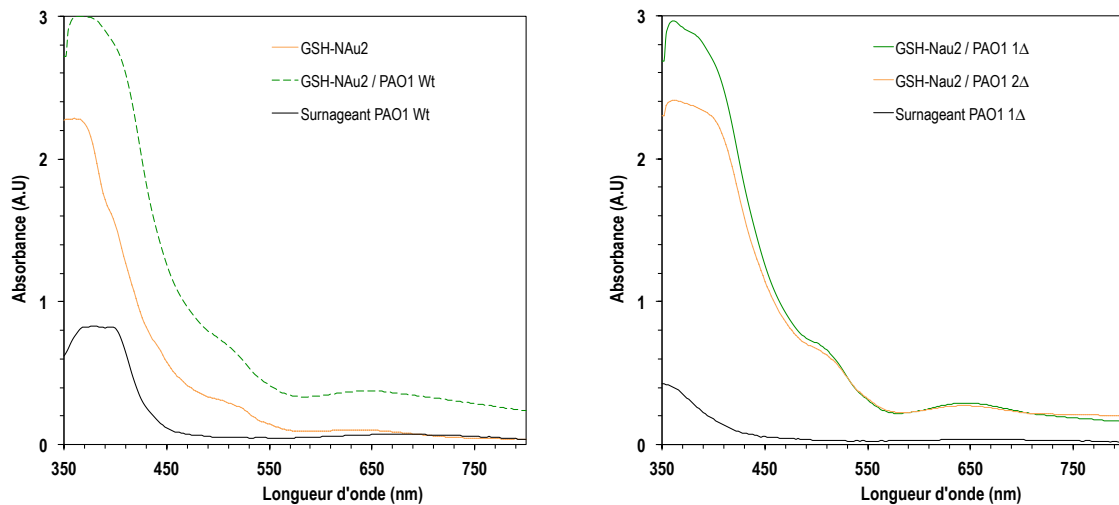


Figure 39 : Spectres d'absorptions réalisés sur les gels GSH-NAu2 incubés en présence des souches PAO1_Wt, PAO1_1Δ ou PAO1_2Δ (48h à 37°C dans du milieu DCAA) et sur les surnageants correspondants.

Enfin, à l'image des résultats présentés en amont, un léger verdissement des gels dopés en nontronites NAu-2 est observé. Ce phénomène s'avère bien moins marqué que celui observé avec la suspension colloïdale et ne peut être attribué avec certitude à une transition Fe(III) \rightarrow Fe(II) au sein de la nontronite. L'explication la plus plausible, démontré en partie par des analyses CP en cours, est d'attribuer ce verdissement à l'adsorption et la rétention de pyocyanine dans la matrice siliceuse. Les propriétés oxydo-réductrices de la pyocyanine, produite lors de stress oxydant, seraient alors impliquées dans la solubilisation du fer. Il est envisageable que la pyocyanine serve de navette à électrons, comme une quinone.

Altération bactérienne des nontronites

Une analyse ICP réalisée sur les surnageants (filtrés à 0,22 μ m) propre à chaque souche pour la condition GSH-NAu2 confirme la dissolution des nontronites par la souche sauvage et révèle la capacité des souches mutées à induire une légère dissolution (Tableau 15). En effet, la différence de fer extrait en solution entre la souche sauvage et les souches mutées est d'un facteur 10. Aucune différence significative n'étant observée entre les deux souches sauvages, la pyochéline n'apparaît pas ici comme acteur du processus de dissolution engendré par *P.aeruginosa* PAO1. En revanche, la production de pyoverdine semble déterminante dans la mobilisation du fer (III) structurale de la nontronite NAu-2, ce qui confirme les résultats obtenus par Ferret sur des particules de smectites ferrifères (Ferret 2012, Ferret et al. 2014).

Tableau 15: Résultats ICP des surnageants propre à chaque souche pour la condition GSH-NAu2 pour l'élément fer.

Souches ->	PAO1_Wt	PAO1_1 Δ	PAO1_2 Δ	Contrôle
Fer total en solution (μ M)	11,14	1,02	1,53	0,17
Ecart-Type	0.36	0.05	0.08	0.01

De manière générale, cette expérience préliminaire confirme la validité des souches PAO1 quant à leur production respective en sidérophores, confirme la capacité des gels de silices à diffuser les métabolites d'intérêts produit par PAO1 tout en interdisant un contact direct cellule/particule et confirme la bio-altérabilité de la nontronite.

4.2. Importance de la structure chimique de la nontronite sur sa réactivité

Des expériences préliminaires réalisées avec *P.aeruginosa* PAO1 ont permis de mettre en évidence l'importance de la structure chimique du minéral sur la biodisponibilité de ses constituants.

La Figure 40 présente deux cultures de *P.aeruginosa* PAO1 sauvage incubées à 37°C pendant 48h dans du milieu DCAA avec des gels de silice (*cf.* Matériels et Méthodes) contenant de la nontronite NAu-1 ou NAu-2. L'observation en lumière fluorescente des deux milieux de culture permet de constater la biodisponibilité relative du fer chez ces deux minéraux (via la production de pyoverdines). De manière surprenante, la biodisponibilité du fer structural des deux nontronites apparaît très différente bien que leur composition chimique soit très similaire (*cf.* Matériels et Méthodes).

La Figure 41 présente deux observations au microscope à épifluorescence de bactéries *P.aeruginosa* PAO1_2Δ *bfrB::gfp* (*cf.* Matériels et Méthodes) incubées au contact de particules NAu-1 ou NAu-2 en suspension colloïdale (T2, 1 g/l final) dans du milieu DCAA pendant 48h à 37°C (agitation 200 rpm). PAO1_2Δ réagit de la même façon que la souche sauvage au contact direct des particules minérales, *i.e.* la formation d'agrégats ou de flocs (« biofilm ») au sein desquels s'agrègent les particules de nontronite.

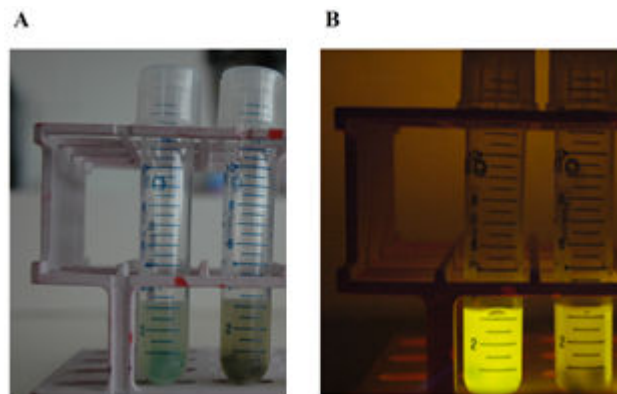


Figure 40 : Photographies en lumière naturelle (A) fluorescente (Excitation 480 SP /Emission 530 LP) (B) de trois cultures de *P.aeruginosa* PAO1 incubées avec des gels de silices contenant (de la gauche vers la droite) des colloïdes des nontronites, NAu-1 et NAu-2.

De même, le floc contenant les colloïdes NAu-2 verdit au cours du temps. En présence de particules NAu-2, on remarque une activité différentielle du gène *bfrB* suivant que les bactéries se trouvent à l'intérieur ou à l'extérieur du floc. Celles localisées au sein du biofilm révèlent la présence de fer biodisponible, tandis que celles à l'extérieur sont a priori en état de carence. En présence de particules NAu-1, l'activité du gène *bfrB* des cellules se trouvant dans le biofilm demeure extrêmement faible. Ces observations confirment la différence de réactivité des deux nontronites et met en évidence la capacité des bactéries PAO1 mutées à déployer un mécanisme d'altération sans l'aide des sidérophores, bien que celui-ci soit de faible efficacité.

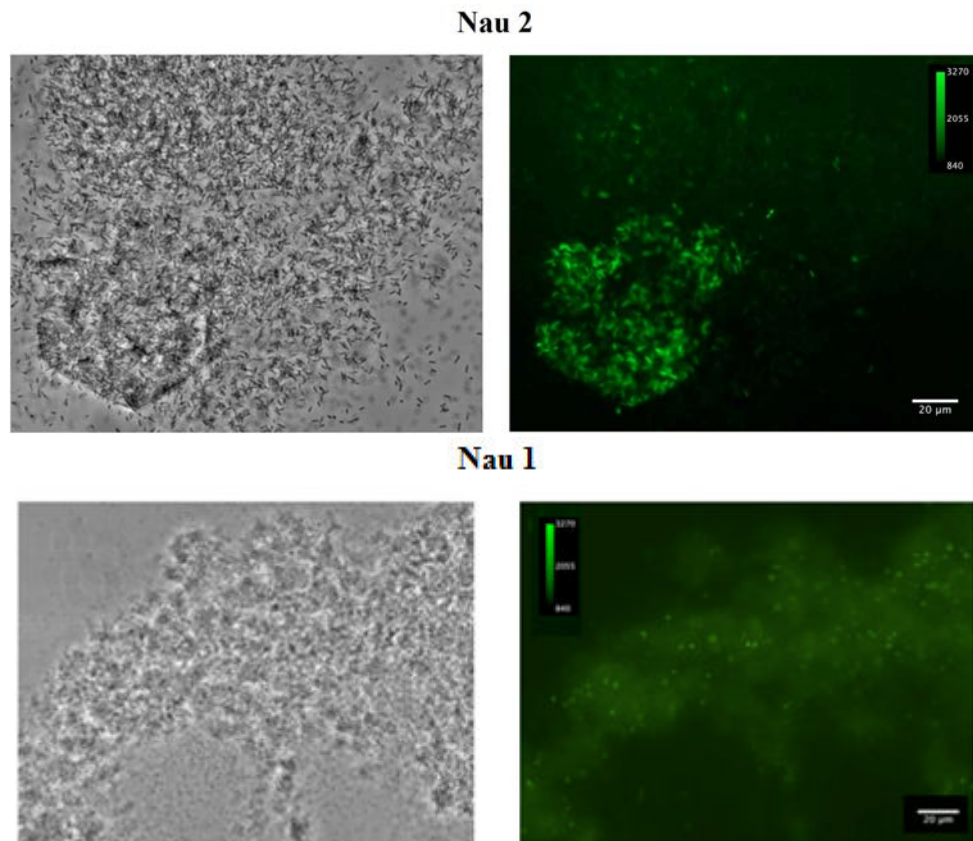


Figure 41: Expression du biosenseur PAO1_2Δ bfrB::gfp en présence de particules de nontronite NAu-1 et NAu-2 (T2). L'activité du promoteur bfrB est proportionnelle à la disponibilité du fer pour les bactéries situées à l'intérieur ou à l'extérieur de l'agrégat particule-bactérie.

L'ensemble de ces expériences préliminaires tendent à démontrer le rôle significatif de la cristallogénèse dans les interactions de type *P.aeruginosa* PAO1 / nontronites, l'importance des sidérophores dans la qualité de ces interactions et potentiellement l'implication de processus rédox. Il est sans doute envisageable qu'il y ait des transformations Fer(III)→ Fer(II) au sein des agrégats contenant des particules de nontronites

5. Application de la méthode CP au système NAu-2/NAu-1/PAO1

En appliquant la méthode développée dans le chapitre précédent sur les spectres d'absorptions en plus des spectres synchrones, il a été possible d'étudier les modifications structurales de nontronites NAu-1 et NAu-2 immobilisés au sein d'une matrice siliceuse, avant et au cours d'altération abiotique et biotique.

5.1. Mélange NAu-1/NAu-2 et altération chimique

Appliquée à la spectrométrie UV-Vis, la méthode CP permet de travailler sur des mélanges de suspension nontronites NAu-1 et NAu-2, tout en assurant une identification univoque des bandes d'absorption caractéristiques des deux nontronites (Figure 42).

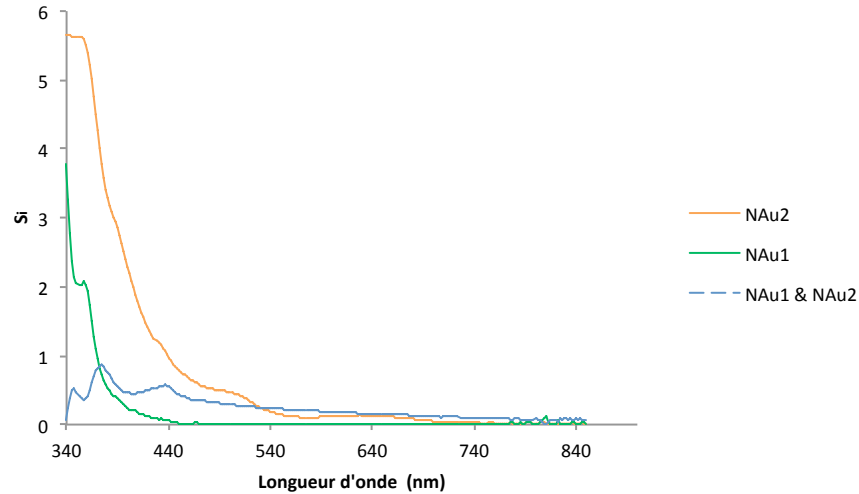


Figure 42: Décomposition CP à 3 sources d'un mélange de particules de nontronite N Au-1 et N Au-2 (T2). La séparation de sources indique les bandes d'absorption spécifiques de N Au-1 et N Au-2, ainsi que celles communes aux deux nontronites (courbe en pointillée)

La décomposition spectrale CP à défaut de donner les spectres ad hoc, identifie et sépare les bandes d'absorption caractéristiques de chaque nontronite de celles communes aux deux. De même, lors d'une altération chimique avec des doses croissantes de dithionite, la méthode CP permet de séparer les contributions des bandes des transitions électroniques 3d du Fe(III) et du Fe(II) dans le spectre de la nontronite N Au-2 (Figure 43).

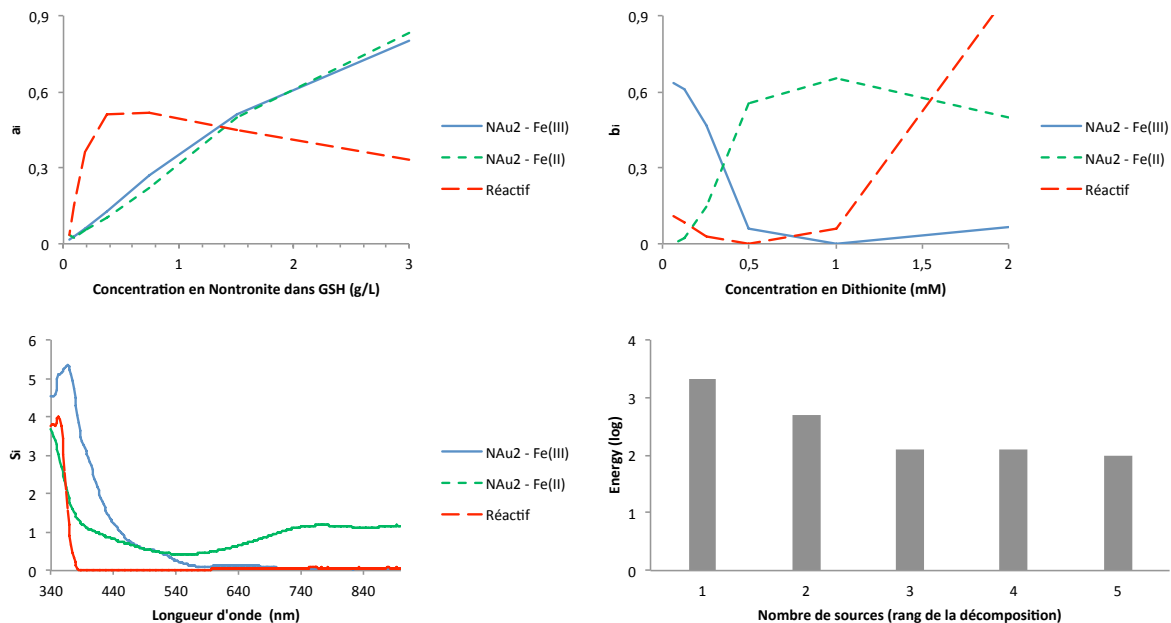


Figure 43 : Décomposition CP de la réduction d'un GSH-N Au2 (T2) en présence d'un réducteur puissant (dithionite $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). La source dénommée « réactif » désigne un produit formé au cours de la réaction dithionite-nontronite.

On retrouve bien que la réduction de N Au-2 en présence de dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) s'accompagne d'une diminution très nette de la bande à 370-380 nm et de l'apparition d'une bande large à 750 nm et d'un continuum au-delà de 800 nm. Les autres bandes à 430 et 530 nm demeurent

inchangées. Ces modifications spectrales ne sont pas détectables ou identifiables directement dans les spectres d'absorption présentés en Figure 39, où la bande dominante à plus basse fréquence est centrée sur 680 nm (maxima de la pyocyanine) (Price-Whelan et al. 2007 ; Reszka et al. 2012).

5.2. Altération biotique (PAO1) sur des mélanges de nontronite N_{Au}-1-N_{Au}-2 (Article 3)

L'article 3 (ci-après) présente une application de la méthode CP sur des gels altérés par *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (sauvage ou mutée sur la production de sidérophores) tout en suivant l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (bfrB et pvdA) chez celle-ci. Les résultats mettent en évidence le rôle respectif de l'acide oxalique, de l'acide citrique, de la pyoverdine et de la pyochéline dans le processus d'altération, le mécanisme impliqué, l'importance de la structure chimique du minéral dans la biodisponibilité de ses constituants, le devenir du fer extrait dans nos conditions (partage entre solution / adsorbée / précipitée) et de conclure sur d'éventuelles interactions mis en jeu par la présence de deux minéraux au sein d'un même système.

Bibliographie

- Acker, J. G., & Bricker, O. P. (1992). The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(8), 3073-3092..
- Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology, 2nd edition, John Wiley and sons, 250p New York.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Balland, C. (2010). Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions: Modélisation et Rôle des Paramètres Environnementaux. Thèse doctorale de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1).
- Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C., & Mustin, C. (2010). Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(19), 5478-5493.
- Barker, W., Welch, S., Chu, S., and Banfield, J., (1998). Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* 83, p 1551-1563.
- Beliaev, A. S., Saffarini, D. A., McLaughlin, J. L., & Hunnicutt, D. (2001). MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Molecular microbiology*, 39(3), 722-730.
- Bennett, P. C., Hiebert, F. K., & Choi, W. J. (1996). Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology*, 132(1), 45-53.
- Bennett, P. C., Rogers, J. R., Choi, W. J., & Hiebert, F. K. (2001). Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18(1), 3-19.
- Berthelin, J., & Leyval, C. (1982). Ability of symbiotic and non-symbiotic rhizospheric microflora of maize (*Zea mays*) to weather micas and to promote plant growth and plant nutrition. *Plant and Soil*, 68(3), 369-377.
- Berthelin, J., 1983. Microbial weathering processes. *Microbial Geochemistry*, Blackwell London, 223-262.
- Beshir, W. B., Eid, S., & Ebraheem, S. (2007). Use of bromocresol green dyed poly (vinyl butyral) film for dosimetric applications. *International Journal of Polymeric Materials*, 56(11), 1067-1077.
- Boukhalfa, H., & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, 15(4), 325-339.
- Boyle, J. R., Voigt, G. K., & Sawhney, B. L. (1974). Chemical weathering of biotite by organic acids. *Soil Science*, 117(1), 42-45.
- Brandt, F., Bosbach, D., Krawczyk-Bärsch, E., Arnold, T., & Bernhard, G. (2003). Chlorite dissolution in the acid pH-range: a combined microscopic and macroscopic approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(8), 1451-1461.
- Brantley, S. L. (2003). Reaction kinetics of primary rock-forming minerals under ambient conditions. *Treatise on geochemistry*, 5, 73-117.

Altération bactérienne des nontronites

- Calvaruso, C., Turpault, M. P., & Frey-Klett, P. (2006). Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1258-1266.
- Cama, J., & Ganor, J. (2006). The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9), 2191-2209.
- Coleman MLL, Hedrick DB, Lovley DR, White DC, Pye K (1993). Reduction of Fe(III) in sediments by sulfate-reducing bacteria. *Nature (Lond)* 361: 436±438.
- Cornelis, P., & Matthijs, S. (2002). Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental microbiology*, 4(12), 787-798.
- Cornelis, P., & Bodilis, J. (2009). A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environmental microbiology reports*, 1(4), 256-262.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1637-1645.
- Drever, J. I., & Stillings, L. L. (1997). The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 120(1), 167-181.
- Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(6), 687-692.
- Ehrlich, HL (1996). Geomicrobiology. Dekker, New York
- Esnault, L. (2010). *Réactivité géomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères: impact sur la sûreté d'un stockage de déchets radioactifs en milieux argileux* (Doctoral dissertation, Nancy 1).
- Ferret C. (2012). Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).
- Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J. Y., Gangloff, S., Schalk, I. J., & Geoffroy, V. A. (2014). Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology Reports*.
- Furrer, G., & Stumm, W. (1986). The coordination chemistry of weathering: I. Dissolution kinetics of $[\delta]$ -Al₂O₃ and BeO. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 50(9), 1847-1860.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological research*, 111(1), 3-49.
- Ganor, J., Mogollón, J. L., & Lasaga, A. C. (1995). The effect of pH on kaolinite dissolution rates and on activation energy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(6), 1037-1052.
- Gaspard, S., Vazquez, F., & Holliger, C. (1998). Localization and solubilization of the iron (III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and environmental microbiology*, 64(9), 3188-3194.
- Gleeson, D. B., Kennedy, N. M., Clipson, N., Melville, K., Gadd, G. M., & McDermott, F. P. (2006). Characterization of bacterial community structure on a weathered pegmatitic granite. *Microbial ecology*, 51(4), 526-534.
- Golubev, S. V., Bauer, A., & Pokrovsky, O. S. (2006). Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25 C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17), 4436-4451.

- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A. & Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11358-11363.
- Gottschalk, G., (1986). *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag New York.
- Griffiths, W. J., Kelly, A. L., & Cox, T. M. (1999). Inherited disorders of iron storage and transport. *Molecular medicine today*, 5(10), 431-438.
- Grybos, M., Billard, P., Desobry-Banon, S., Michot, L. J., Lenain, J. F., & Mustin, C. (2011). Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. *Journal of colloid and interface science*, 362(2), 317-324.
- Grybos, M., Michot, L. J., Skiba, M., Billard, P., & Mustin, C. (2010). Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: Evidence for basal surface reactivity of nontronite. *Journal of colloid and interface science*, 343(2), 433-438.
- Guerinot, M. L. (1994). Microbial iron transport. *Annual Reviews in Microbiology*, 48(1), 743-772.
- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D. & Fraser, C. M. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature biotechnology*, 20(11), 1118-1123.
- Heinrichs, D. E., & Poole, K. E. I. T. H. (1993). Cloning and sequence analysis of a gene (pchR) encoding an AraC family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 175(18), 5882-5889.
- Heinrichs, D. E., & Poole, K. (1996). PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (fptA) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. *Journal of bacteriology*, 178(9), 2586-2592.
- Helgeson, H. C., Murphy, W. M., & Aagaard, P. (1984). Thermodynamic and kinetic constraints on reaction rates among minerals and aqueous solutions. II. Rate constants, effective surface area, and the hydrolysis of feldspar. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(12), 2405-2432.
- Hersman, L., Lloyd, T., & Sposito, G. (1995). Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(16), 3327-3330.
- Hutchens, E., Clipson, N., and McDermott, F. P., (2008a). Mineralogical influence on the structure and the diversity of bacterial communities associated with silicate minerals. *Geophysical Research Abstracts* 10, EGU2008-A-03930.
- Hutchens, E., McDermott, F. P., and clipson, N., (2008b). Bacteria, fungi and arche on silicate minerals- A case for selective colonization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 404.
- Ilyaletdinov AN, Abdrashitova SA (1981) Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologiya* 50: 197±204 (*Microbiology NY* 50: 135±140)
- Jeanroy, E., (1983). Diagnostic des formes du fer dans les pédogénèses tempérées. Évaluation par les réactifs chimique d'extraction et apports de la spectrométrie mossbauer. Doctorat Thesis, Université de Nancy 1.
- Kalinowski, B. E., & Schweda, P. (1996). Kinetics of muscovite, phlogopite, and biotite dissolution and alteration at pH 1–4, room temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(3), 367-385.

Altération bactérienne des nontronites

- Kalinowski, B. E., Liermann, L. J., Givens, S., & Brantley, S. L. (2000). Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chemical Geology*, 169(3), 357-370.
- Klein, D. J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2004). The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *Rna*, 10(9), 1366-1379.
- Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, G., & Berthelin, J. (1990). Weathering of micas in the rhizospheres of maize, pine and beech seedlings influenced by mycorrhizal and bacterial inoculation. *Symbiosis (Rehovot)*, 9(1-3), 105-109.
- Lialikova, N. N., Vedenina, I., & Romanova, A. K. (1975). Assimilation of carbon dioxide by *Stibiobacter senarmontii*. *Mikrobiologija*, 45, 552-554.
- Liermann, L. J., Kalinowski, B. E., Brantley, S. L., & Ferry, J. G. (2000). Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64(4), 587-602.
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1988). Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Applied and environmental microbiology*, 54(6), 1472-1480.
- Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 497-508.
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J., & Woodward, J. C. (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382(6590), 445-448.
- Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A., & Goodwin, S. (1993). *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of microbiology*, 159(4), 336-344.
- Lovley, D.R. (2000). Fe(III) and Mn(IV) reduction. In *Environmental Microbe–Metal Interactions*. ed. Lovley, D.R. pp. 3–30. Washington: ASM. ISBN 1555811957.
- Luu, Y. S., & Ramsay, J. A. (2003). Review: microbial mechanisms of accessing insoluble Fe (III) as an energy source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 215-225.
- Malmström, M., & Banwart, S. (1997). Biotite dissolution at 25 C: The pH dependence of dissolution rate and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(14), 2779-2799.
- Malmström, M., Banwart, S., Lewenhagen, J., Duro, L., & Bruno, J. (1996). The dissolution of biotite and chlorite at 25 C in the near-neutral pH region. *Journal of contaminant hydrology*, 21(1), 201-213.
- Matthijs, S., Laus, G., Meyer, J. M., Abbaspour-Tehrani, K., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., & Cornelis, P. (2009). Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals*, 22(6), 951-964.
- Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M., & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environmental microbiology*, 9(2), 425-434.
- Merola, R. B., & McGuire, M. M. (2009). Crystallographic site distribution and redox activity of Fe in nontronites determined by optical spectroscopy. *Clays and Clay Minerals*, 57(6), 771-778.

- Methe, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F. & Fraser, C. M. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, 302(5652), 1967-1969.
- Meyer, J. A., & Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107(2), 319-328.
- Meyer, J. M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., & Budzikiewicz, H. (2008). Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*, 21(3), 259-271.
- Moon, C. D., Zhang, X. X., Matthijs, S., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., & Rainey, P. B. (2008). Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC microbiology*, 8(1), 7.
- Mossialos, D., & Amoutzias, G. D. (2007). Siderophores in fluorescent pseudomonads: new tricks from an old dog.
- Murakami, T., Utsunomiya, S., Yokoyama, T., & Kasama, T. (2003). Biotite dissolution processes and mechanisms in the laboratory and in nature: Early stage weathering environment and vermiculitization. *American Mineralogist*, 88(2-3), 377-386.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1993). Role of menaquinone in the reduction of fumarate, nitrate, iron (III) and manganese (IV) by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *FEMS microbiology letters*, 114(2), 215-222.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (2004). *Shewanella oneidensis* MR-1 restores menaquinone synthesis to a menaquinone-negative mutant. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5415-5425.
- Myers, C. R., & Myers, J. M. (1992). Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3429-3438.
- Newman, D. K., & Kolter, R. (2000). A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature*, 405(6782), 94-97.
- Oulkadi, D., Balland-Bolou-Bi, C., Billard, P., Kitzinger, G., Parrello, D., Mustin, C., & Banon, S. (2014). Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels. *FEMS microbiology letters*, 354(1), 37-45.
- Oulkadi, D., Yemloul, M., Desobry-Banon, S., & Canet, D. (2013). Water behavior in hybrid silica gels as studied by ^1H nuclear magnetic resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers. *Microporous and Mesoporous Materials*, 172, 213-216.
- Perronnet, M. (2004). Réactivité des matériaux argileux dans un contexte de corrosion métallique. Application au stockage profond des déchets radioactifs en site argileux (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine-INPL).
- Powell, P. E., Cline, G. R., Reid, C. P. P., & Szaniszlo, P. J. (1980). Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* 287, 833 – 834.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E., & Newman, D. K. (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology*, 189(17), 6372-6381.

Altération bactérienne des nontronites

- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S., & Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC genomics*, *10*(1), 394.
- Ravel, J., & Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends in microbiology*, *11*(5), 195-200.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, *435*(7045), 1098-1101.
- Reszka, K. J., Xiong, Y., Sallans, L., Pasula, R., Olakanmi, O., Hassett, D. J., & Britigan, B. E. (2012). Inactivation of the potent *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin pyocyanin by airway peroxidases and nitrite. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *302*(10), L1044-L1056.
- Robert, M. and Berthelin, J., 1986. Role of biological and Biochemical factors in soil mineral weathering. *Soil science society of America*, *12*, 453-495.
- Rogers, J. R., & Bennett, P. C. (2004). Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology*, *203*(1), 91-108.
- Rozenson, I., & Heller-Kallai, L. (1976). Reduction and oxidation of Fe³⁺ in dioctahedral smectites-1: Reduction with hydrazine and dithionite. *Clays and Clay Minerals*, *24*, 271-282.
- Saffarini, D. A., Blumerman, S. L., & Mansoorabadi, K. J. (2002). Role of menaquinones in Fe (III) reduction by membrane fractions of *Shewanella putrefaciens*. *Journal of bacteriology*, *184*(3), 846-848.
- Santelli, C. M., Welch, S. A., Westrich, H. R., & Banfield, J. F. (2001). The effect of Fe-oxidizing bacteria on Fe-silicate mineral dissolution. *Chemical Geology*, *180*(1), 99-115.
- Scott, D. T., McKnight, D. M., Blunt-Harris, E. L., Kolesar, S. E., & Lovley, D. R. (1998). Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environmental Science & Technology*, *32*(19), 2984-2989.
- Sherman, D. M., & Vergo, N. (1988). Optical (diffuse reflectance) and Mössbauer spectroscopic study of nontronite and related Fe-bearing smectites. *American Mineralogist*, *73*(11-12), 1346-1354.
- Shi, L., Squier, T. C., Zachara, J. M., & Fredrickson, J. K. (2007). Respiration of metal (hydr) oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihaem c-type cytochromes. *Molecular microbiology*, *65*(1), 12-20.
- Song, W., Ogawa, N., Oguchi, C. T., Hatta, T., & Matsukura, Y. (2007). Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment. *Catena*, *70*(3), 275-281.
- Sposito, G. (1989). The chemistry of soils. Oxford University Press. New York.
- Stillings, L. L., & Brantley, S. L. (1995). Feldspar dissolution at 25 C and pH 3: Reaction stoichiometry and the effect of cations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *59*(8), 1483-1496.
- Stillings, L. L., Drever, J. I., Brantley, S. L., Sun, Y., & Oxburgh, R. (1996). rates of feldspar dissolution at pH 3-7 with 0-8 mM oxalic acid. *Chemical Geology*, *132*(1), 79-89.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics*, *373*(1), 1-6.
- Ullman, W. J., Kirchman, D. L., Welch, S. A., & Vandevivere, P. (1996). Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology*, *132*(1), 11-17.

- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., & Frey-Klett, P. (2009). Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in microbiology*, 17(8), 378-387.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C., & Frey-Klett, P. (2007). Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 3019-3027.
- Valsami-Jones, E., McEldowney, S., Cotter-Howells, J. D., Campbell, L. S., & Batchelder, M. (2000). Mineral dissolution by heterotrophic bacteria: principles and methodologies. *Environmental Mineralogy: Microbial interactions, anthropogenic influences, contaminated land and waste management*, 27-55.
- Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54(1), 75-87.
- Von Wandruszka, R. (2006). Phosphorus retention in calcareous soils and the effect of organic matter on its mobility. *Geochemical transactions*, 7(6).
- Wang, Y. T., & Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 159-163.
- Weber, K. A., Achenbach, L. A., & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764.
- Welch, S. A., & Ullman, W. J. (1993). The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(12), 2725-2736..
- Welch, S. A., & Ullman, W. J. (1999). The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 and 35 C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19), 3247-3259.
- Welch, S. A., & Ullman, W. J. (2000). The temperature dependence of bytownite feldspar dissolution in neutral aqueous solutions of inorganic and organic ligands at low temperature (5–35 C). *Chemical Geology*, 167(3), 337-354.
- Welch, S. A., & Vandevivere, P. (1994). Effect of microbial and other naturally occurring polymers on mineral dissolution. *Geomicrobiology journal*, 12(4), 227-238.
- Welch, S. A., Taunton, A. E., & Banfield, J. F. (2002). Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal*, 19(3), 343-367.
- Wieland, E., & Stumm, W. (1992). Dissolution kinetics of kaolinite in acidic aqueous solutions at 25° C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(9), 3339-3355.
- Wu, L., Jacobson, A. D., Chen, H. C., & Hausner, M. (2007). Characterization of elemental release during microbe–basalt interactions atn T = 28° C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(9), 2224-2239.
- Wu, L., Jacobson, A. D., & Hausner, M. (2008). Characterization of elemental release during microbe–granite interactions at T= 28° C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4), 1076-1095.
- Zobell, C. E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*, 46(1), 39.

Bio-uptake of Structural Iron controlled by the Crystallochemistry of Nontronite

Parrello Damien, Billard Patrick, Zegeye Asfaw, David Brie, Sebastian Miron and Mustin Christian

En préparation ; non soumis

Résumé

*This research investigated the potential role of siderophores excreted by a common soil bacterium *Pseudomonas aeruginosa* WT and an engineered mutant, *P. aeruginosa* Δ pvdA that was incapable of pyoverdine production, in Fe(III) acquisition from two Fe (III) bearing colloidal nontronite clays. The minerals, Nau-1 and NAu-2, were trapped in a silica matrix to avoid a physical cell-mineral contact. A multi-parametric approach coupled to Candecompt / Parafac spectral decomposition was used to monitor the Fe(III) solubilisation and the production of pyoverdine. *P. aeruginosa* WT was able to acquire Fe(III) from the two nontronites while the mutant was capable to only uptake Fe(III) when a physical contact was established with the mineral indicating that a siderophore independent mechanism was likely implemented. The structural Fe(III) of Nau-2 rather than of Nau-1 appeared to be more bioavailable, suggesting that the crystal chemical localisation of Fe, in the tetrahedron and / or in the octahedron sites, governs the solubilisation of Fe.*

Bio-uptake of Structural Iron controlled by The Crystallochemistry of Nontronite

Parrello Damien^{*†}, Billard Patrick⁺, Zegeye Asfaw⁺, David Brie[†], Sebastian Miron [†] and Mustin Christian⁺

Corresponding Author: damien.parrello@univ-lorraine.fr

⁺ **Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC)**
UMR 7360 CNRS - Université de Lorraine, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

[†] **Laboratoire en Automatique de Nancy (CRAN)**

UMR 7039 CNRS - Université de Lorraine, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY

Abstract:

This research investigated the potential role of siderophores excreted by a common soil bacterium *Pseudomonas aeruginosa* WT and an engineered mutant, *P. aeruginosa* Δ pvdA that was incapable of pyoverdine production, in Fe(III) acquisition from two Fe (III) bearing colloidal nontronite clays. The minerals, Nau-1 and NAu-2, were trapped in a silica matrix to avoid a physical cell-mineral contact. A multi-parametric approach coupled to Candecompt / Parafac spectral decomposition was used to monitor the Fe(III) solubilisation and the production of pyoverdine. *P. aeruginosa* WT was able to acquire Fe(III) from the two nontronites while the mutant was capable to only uptake Fe(III) when a physical contact was established with the mineral indicating that a siderophore independent mechanism was likely implemented. The structural Fe(III) of Nau-2 rather than of Nau-1 appeared to be more bioavailable, suggesting that the crystal chemical localisation of Fe, in the tetrahedron and / or in the octahedron sites, governs the solubilisation of Fe.

Introduction

Iron is an essential nutrient and it plays a central role in the growth and the development of most living organisms. Due to its redox chemistry (+ 300 mv to - 500 mv), Fe is required for several fundamental enzymatic processes including respiration, photosynthesis, DNA synthesis. Thus, most organisms require micro molar concentration of Fe to support fundamental metabolic processes (1). Although widespread in the environment, Fe is very insoluble in oxic conditions at circum-neutral pH which tends to limit the concentration of dissolved Fe³⁺ (2). For instance the solubility products of iron oxides ranges from 10⁻³⁹ to 10⁻⁴⁴ M (2), thus the bioavailable Fe concentration falls much below bacteria metabolic need. Therefore, to overcome the low abundance of free Fe in aerobic environments, bacteria have developed different strategies such as the excretion of protons and / or low molecular weight organic acids (*e.g.* citrate, oxalate) (3). These metabolites alter the mineral by decreasing the pH or by forming complexes with the surface ions and subsequently solubilizing the Fe(III) from the mineral lattice by either proton-promoted or ligand-promoted dissolution (4).

The synthesis and the excretion of siderophores is another important avenue used by bacteria for Fe acquisition in iron-limited environments (5) (6). Siderophores are low molecular weight organic molecules, with an extremely high affinities for Fe(III) and as such they are capable to solubilize Fe(III) from minerals lattices. These multi-dentate ligands display a high affinity for Fe, up to 10⁵² and consequently they are considered to be one of the main molecules involved in the Fe(III) bio-uptake in the rhizosphere (7) (6) (8). For instance, *Pseudomonas* species, commonly found in soils and in surface waters produce and excrete two major siderophores, pyoverdine and pyochelin under iron

deficient conditions (7) (9) (10). Pyoverdine is a dihydroxyquinoline- derived chromophore to which a short peptide chain is attached (11) and binds Fe^{3+} in a 1:1 stoichiometry with a stability constant for Fe(III) around 10^{32} M^{-1} (12). On the other hand pyochelin is derived from thiazoline [2(2-*o*-hydroxyphenyl-2-thiazolin-4-yl)-3-methylthiazolidine-4-carboxylic acid] (9), which binds Fe^{3+} in a 2:1 stoichiometry with a stability constant for Fe(III) around 10^{17} M^{-1} (10).

The dissolution of Fe(III) bearing minerals such as iron oxides, clay minerals, triggered by siderophores has been subject of numerous studies (13), (14), (15), (16) and have highlighted different key parameters. For instance, the efficiency of Fe(III) uptake by siderophores is enhanced in the presence of organic acids such as oxalate, a common metabolite resulting from bacterial activity. This suggested synergic action consists on the one hand, the labialisation of the structural Fe by oxalate and on the other hand, the detachment of the labile pool of Fe(III)-oxalate surface complexes by the siderophores, thus driving the reaction toward more dissolution (17). Interestingly, an additive effect rather than a synergic one was observed when ascorbate, a reducing agent, was used instead of oxalate, showing the complex interplay between siderophores and organic molecules during the dissolution of structural Fe(III) (18) (14). Additionally, Dehner *et al.*, (2011) have shown that the uptake of Fe(III) from hematite was governed by the particles size in the presence of *P. mendocina*, a strain producing and excreting siderophores. Indeed, Fe(III) associated with particles less than a few tens of nm was more bioavailable than Fe(III) associated with larger particles emphasizing the significance to probe particle size when assessing bioavailability. Together these studies stress that mineral weathering is a combination of various and complex set of interactions between the mineral and the bacteria. These complex biotic and abiotic interactions likely overcome thermodynamic and kinetic constraint imposed by the mineralogy, the texture and crystallo-chemistry of the mineral leading to the bio-release of structural Fe.

Although iron oxides are the ultimate source of Fe, Fe bearing clay minerals can also play the role of Fe pool for bacterial metabolism. Recent experiments show that structural Fe(III) in smectite, a 2:1 phyllosilicate are bioavailable for bacterial uptake (19) (20) (21). However, there still a gap in our knowledge whether the structural Fe(III) site occupancy influences the bioavailability of Fe. NAu-1 and NAu-2 are two nontronite, hydrous Fe(III) bearing di-octahedral clay minerals. They are 2:1 phyllosilicate of similar composition with two tetrahedral sheets per octahedral sheet. The structural Fe(III) are located in both the tetrahedrons and in the octahedrons for the two nontronite, the main difference being that 2 % of total iron is located in the tetrahedral sheet for NAu-1 against 8 % for NAu-2.

The aim of this study was therefore to study the bioavailability of Fe using two nontronites, Nau-1 and Nau-2, to determine whether the Fe(III)'s crystallographic sites (tetrahedrons *versus* octahedrons) control its uptake by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The wild-type *P. aeruginosa* PAO1 and the pyoverdine deficient PAO1 $\Delta pvdA$ mutant strain (22) were used in bio-weathering experiments. *E. coli* DH10B was used as a host for plasmid cloning. The construction of plasmid pPB-bfrB-O561, which contains an iron responsive *bfrB-E2Orange* gene fusion, has been detailed elsewhere (Parrello *et al.*, submitted). Bacteria were routinely grown aerobically on LB agar or in LB broth at 37°C. Deferrated Casamino Acids medium (DCAA medium) (23) was used for mineral weathering experiments. When required, the medium was supplemented with kanamycin at final concentrations of 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *E. coli* or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *P. aeruginosa*.

Preparation of nontronite embedded hybrid silica gels

Two nontronites, NAu-1 and NAu-2, purchased from the Source Clays Minerals repository at Purdue University were used for bio-weathering experiments. NAu-1 and NAu-2 contain Fe(III) in different structural sites and are defined by the structural formula $(\text{Si}_{16.98}\text{Al}_{0.95})$

$\text{Fe}_{0.07}(\text{Al}_{0.36}\text{Fe}_{3.61}\text{Mg}_{0.04})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{1.05}$ and $(\text{Si}_{7.55}\text{Al}_{0.16}\text{Fe}_{0.29})(\text{Al}_{0.34}\text{Fe}_{3.54}\text{Mg}_{0.05})\text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.72}$, respectively. The size of the particles used in the present study was 460 nm in length 60 nm in width and around 0.76 nm thickness for N Au-1 and 368 nm in length 93 nm in width and around 1 nm thickness for N Au-2 (24). Hybrid silica gels were prepared by immobilisation of nontronite particles in a microporous, tetraethylorthosilicate (TEOS, Fluka)-derived silica gels by a sol-gel technique as described previously (25) (26) (27). For this study, the procedure was automated and silica gels were produced in 96-wells microplates (MTP 96/F-bottom, Eppendorf) with the use of epMotion 5070's automated pipetting system (Eppendorf). The gel plugs had a volume of 0.2 ml and contained 2.60 g L⁻¹ of either N Au-1 or N Au-2, or both nontronites at particle concentrations (N Au-1 + N Au-2) ranging from 0 to 2.60 g L⁻¹ and N Au-1 / N Au-2 ratios ranging from 0 to 100%.

Bio-weathering experiments

The nontronite weathering ability of *P. aeruginosa* was determined through the incubation of bacteria with nontronite embedded in hybrid silica gels in different conditions and by further measuring the release of iron from the mineral and the production of organic acids and pyoverdine. *P. aeruginosa* strains were grown overnight in *LB* broth. The cells were harvested by centrifugation, washed twice with DCAA and the cell pellets were suspended in the same medium at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 1.

To measure the kinetics of organic acids production, suspensions of PAO1 WT and $\Delta pvdA$ mutant strains were separately inoculated to OD₆₀₀ of 0.1 in 4 ml of DCAA medium supplemented with four 0.2 ml silica gel plugs containing N au-1 or N au-2 particles (2.60 g/l). Incubations were performed in triplicate at 37°C with shaking at 260 rpm for 60h. After 2, 6, 12, 36 and 60h of incubation, 100 µl of each culture were diluted in 900 µl of ultrapure water and centrifuged at 13 500 x g for 5 minutes. Supernatants were then filtered with 0.22 µm pore size filters (Millipore) and stored at -20°C before organic acids quantification.

To assess the respective role of nontronite structure and pyoverdine production in the bio-weathering process, suspensions of PAO1 WT and $\Delta pvdA$ mutant strains were inoculated to OD₆₀₀ of 0.1 in tubes with 2 ml of DCAA and four silica gels plugs containing 25 combined concentrations (i.e. 0, 1, 2, 3 and 2.60 g L⁻¹) and ratios (i.e. 0, 25, 50, 75 and 100%) of N au-1 / N au-2 particles. The suspensions were incubated at 37°C with shaking for 24h before determination of iron and pyoverdine concentration.

Analytical methods

Organic acids were quantified from weathering solutions using an ion chromatograph (ICS 3000, Dionex corp.) equipped with an Ion Pac® column (AS 11 HC, Dionex corp.) according to a KOH gradient of 0.9-60 mM over 50 min at a flow rate of 1.3 mL per min. Standard solutions (0.1 mM) used were sodium acetate, sodium citrate, sodium formate, sodium gluconate, sodium D, L-malate, sodium oxalate, sodium propionate, sodium succinate, (Sigma Aldrich), sodium lactate and sodium malonate (Fluka). Measurement uncertainty was lower than 0.5% for all organic acids and the detection limit was close to 0.1 ppm.

Iron concentration in weathering solutions was measured spectrophotometrically at 565 nm by adding 20 µl of Ferrospectral® (Merck, Millipore) dye indicator to 200 µl of 0.22 µm filtered culture supernatants. The fraction of iron adsorbed onto silica gels and embedded on mineral surfaces was estimated by treating 1 volume of silica gel with 2 volume of KCl (1 M). After 1 hour of incubation at 28 °C, Ferrospectral® dye indicator was added as described above. The fraction of iron precipitated onto silica and mineral surfaces was estimated by treating 1 volume of silica gel with 2 volume of hydroxylamine solution (0.2% NH₂OH in KCl 1M) for 1 hour at 28 °C before addition of Ferrospectral®.

Concentration of pyoverdine in culture supernatants was quantified spectrophotometrically by measuring the absorbance at 400 nm with $\epsilon = 19\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at pH = 7 (28).

Synchronous fluorescence spectroscopy-based analysis of bacterial cultures

Pyoverdine production and fluorescence emission from iron bioreporter PAO1/pPB-bfrB-O561 strain were measured simultaneously by means of a recently developed approach that couples synchronous fluorescent spectroscopy (SFS) with blind spectral decomposition of the fluorescence data by the Candecomp / Parafac (CP) model (Parrello et al., submitted) (29). Briefly, 200 μ l from cultures grown with different concentrations and ratios of Nau1/Nau2 particles were transferred in 96 well microplates. Synchronous fluorescence spectra were performed using a two-grating monochromator spectrofluorometer FLX-Xenius (SAFAS, Monaco), equipped with a 150 W xenon lamp. The SFS of cell suspensions was measured in the excitation wavelength range of 450–600 nm at a constant offset value $\Delta\lambda$ of 20 nm. Spectra were recorded in 2 nm steps with excitation and emission slit widths of 10 nm and the photomultiplier voltage set at 800 V.

In addition to SFS, changes in absorption spectra of the silica gel plugs were monitored by scanning the samples from 300 to 900 nm in 2 nm steps and with a 2 nm bandwidth.

Raw fluorescence and absorption data were collected and exported for further signal processing with Candecomp/Parafac algorithms running under Matlab software

Blind spectral decomposition by Candecomp/Parafac

The acquisition of SFS spectra as a function of two crossed parameters (i.e. the concentration of nontronite and the Nau1/Nau2 ratio in silica gels) generated a three-way data array \mathcal{X} , which can be expressed by the following tri-linear CP model:

$$\mathcal{X}_{m,p,n} = \sum_{r=1}^R a_{mr} \cdot b_{pr} \cdot s_{nr} + \mathcal{F}_{m,p,n}$$

where R is the number of fluorescence sources (i.e. decomposition rank). \mathcal{F} is the residual error term including experimental error, signal noise or ‘non-linear’ component behavior. The matrices \mathbf{A} and \mathbf{B} characterize the behavior of the R sources according to the two experimental parameters. The matrix \mathbf{S} characterizes the spectral shape of the identified sources. The rank R of the decomposition is assessed experimentally by observing the decrease of the energy of the fitting error \mathcal{F} as the number of components is increasing. The retained value is then obtained after successive trials using possible values of R around the value of R found before.

Results and discussion

Bio-dissolution of structural iron of colloidal size NAu-1 and NAu-2

Iron bio-dissolution from colloidal NAu-1 and NAu-2 trapped in a porous silica gel was investigated in a multi-parametric system where the NAu-1 and Nau-2 ratio was varied across a range of particle concentrations. Preliminary experiments indicated that the mineral trapping procedure neither affected the mineral structure nor prompted its dissolution as no iron was detected in the media without the presence of bacteria (results not shown) (25), (26). Additionally, the nontronite particles included in the silica gel were in a colloidal form, thus the reactivity of the mineral, if any, would not likely be affected by a change of its surface area (due to aggregation), or to physical defects (stacking faults, mixed layering). Another interesting feature was the absence of physical contact between the mineral and the bacteria cells once the mineral was trapped in the silica gel (25), (26). Therefore, the proposed study allows assessing the dissolution of Fe(III) from colloidal Nau-1 and Nau-2 without a direct contact with *P. aeruginosa* cells. The dissolution, if any, would be more likely related to the diffusion of organic molecules through the micro-porous silica gel.

The multi-way approach consisted of 25 independent assays where the nontronite particle concentrations and NAu-1 / NAu-2 ratio were varied all together leading to a three way data set. For instance, figure 1A represents the Fe dissolution profile when the assays were run with a constant

nontronite ratio (100% of NAu-2 with $[\text{NAu-1}]/([\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}]) = 0\%$) across a range of particle concentration (0 to 2.6 g L^{-1}) in the presence of PAO1-WT. Figure 2A, on the other hand, illustrates the Fe dissolution profile when the assays were run with a constant particle concentration (*i.e.* 2.6 g L^{-1}) while varying NAu-1 and NAu-2 ratio (*i.e.* $0 \leq [\text{NAu-1}]/([\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}]) \leq 100\%$) in the presence of *P. aeruginosa* WT.

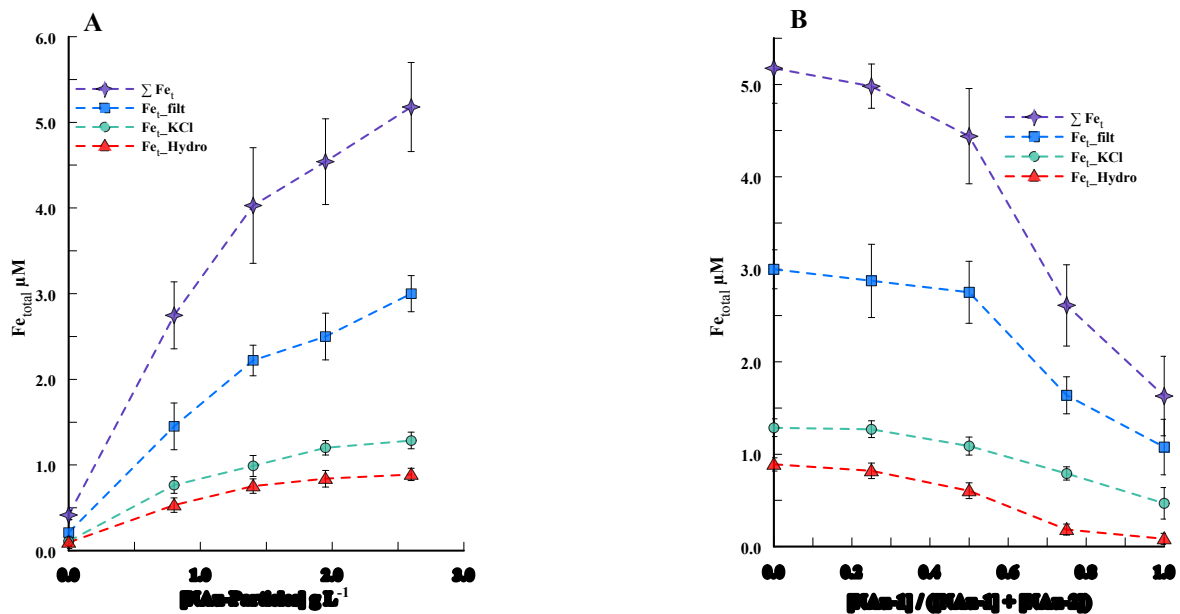


Figure 1: Microbial Fe dissolution in a system, where NAu-1 and NAu-2 ratio are varied across a range of particles concentration, after 24 H of incubation. (A) Fe dissolution where the NAu-1 and NAu-2 ratio is kept constant ($[\text{NAu-1}]/([\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}]) = 0$) while the particle concentration is varied. (B) Fe dissolution where the particle concentration is kept constant (2.6 g L^{-1}) with different NAu-1 and NAu-2 ratio. The symbols represent soluble Fe (squares), KCl extracted Fe (circles), Hydroxylamine-KCl extracted Fe (triangles) and the sum of Fe concentration after the different extraction described above (stars). Errors bars depict the standard deviation of the mean.

An increase of Fe released in the culture media was observed with increasing the particle concentration indicating that the diffusion of organic molecules, responsible for the dissolution of Fe, through the porous silica gel was not a limiting factor in the range of particle concentrations tested (Fig. 1A). For the assay run with the higher particle concentration (*i.e.* 2.6 g L^{-1}) a total of $5.18 \pm 0.21 \text{ μM}$ of Fe were released in the culture media, 58 % of which were soluble Fe. The same trend (soluble over total Fe) was noted across the entire particles concentrations tested (Fig. 1A). The presence of KCl and hydroxylamine extracted Fe indicated that a small fraction of the dissolved iron was adsorbed and/or precipitated on the mineral and/or on the silica gel (Fig. 1A). Overall the results show that a substantial amount of Fe was liberated in the culture media. Given the fact NAu particles are highly insoluble at circum-neutral pH, the Fe that was present in the media was likely chelated by organic molecules (*i.e.* excreted by bacterial activity), thus becoming available for bacterial uptake. Similarly, the closely related strain *Pseudomonas mendocina* ymp requires micro molar concentration of Fe for optimal growth (1). Likewise, the amount of Fe dissolved from NAu-2 in the culture media would be sufficient to support *P. aeruginosa* growth.

A significant amount of the released Fe ($\approx 60\%$) was present in solution for the different ratio tested, indicating that the variation of NAu-1 and NAu-2 ratio did not increase or affect the adsorbed and/or the precipitated Fe fraction (Fig. 1B). A two-trend pattern is observed during the release of Fe while varying the ratio: (i) in the ratio range of $0\% \leq [\text{NAu-1}]/([\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}]) \leq 50\%$, the total amount of dissolved Fe decreased from $5.18 \pm 0.21 \text{ μM}$ to $4.44 \pm 0.33 \text{ μM}$ (*i.e.* a decrease of $\approx 15\%$) and (ii) in the range of $50\% \leq [\text{NAu-1}]/([\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}]) \leq 100\%$ a higher decrease was registered from $4.44 \pm 0.33 \text{ μM}$ to $1.63 \text{ μM} \pm 0.30$ (*i.e.* a decrease of $\approx 65\%$). The data indicate that *P. aeruginosa* did not acquire as much Fe in the presence of NAu-1 than NAu-2. Because NAu-1 and NAu-2 were in a

colloidal form in the silica gel and had almost the same surface area, their respective reactivity would not be affected by a change of surface area due to aggregation. Thus, the difference of reactivity observed between the two forms of nontronite is likely based on their crystallography distinctiveness.

The same multi-way experiments were run with *P. aeruginosa* Δ pvdA, a metabolically engineered mutant strain unable to synthesize pyoverdine. By contrast to the *P. aeruginosa* WT the dissolved Fe was below the detection limit. The fact that no iron was detected after KCl and hydroxylamine-KCl extraction suggested that the absence of detectable Fe in solution could not be explained by the adsorption or precipitation of Fe on the mineral and / or the silica gel surface. The data imply that the mutant strain was not capable to dissolve any Fe(III) from NAu-1 or NAu-2 in our experimental set up. This observation is in contrast with the work of Ferret et al., 2014 (20), where the authors have shown the growth of a pyoverdine deficient mutant, in the presence of smectite. This discrepancy could be explained by the fact that in our study, no physical contact was established between the bacteria cells and the mineral particles that could decrease the ability of the mutant to dissolve structural Fe(III).

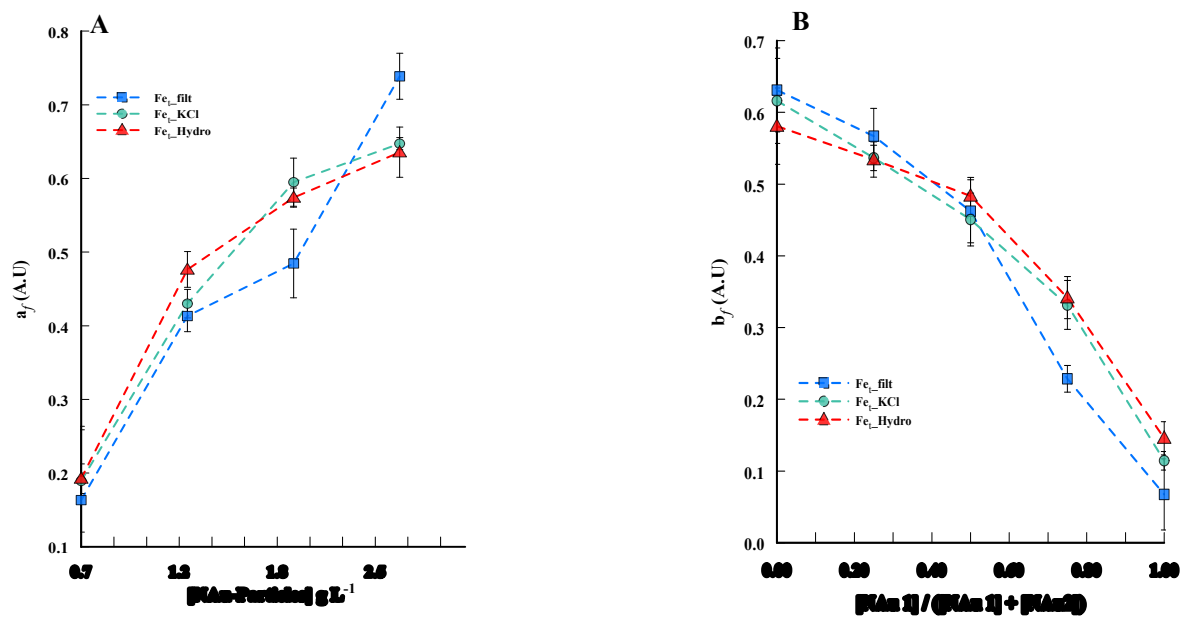


Figure 2: The pattern of iron release determined after a CP decomposition of the 3-way data set with 6 components. (A) Qualitatif behavior of Fe dissolution as a function of all ratio tested ($1 \geq [NAu-1] / ([NAu-1] + [NAu-2]) \geq 0$) across a range of particle concentration. (B) Qualitatif behavior of Fe dissolution as a function of all particle concentration (0 to 2.6 $g L^{-1}$) tested across a range of NAu-1 and NAu-2 ratio. The symbols represent the behavior of soluble Fe (squares), KCl extracted Fe (circles), hydroxylamine-KCl extracted Fe (triangles). Errors bars depict the standard deviation of the mean.

To understand the general behaviour of iron release by bacterial activity, it is necessary to consider all together the 25 independent assays run in this study by varying both NAu-1 / NAu-2 ratio and the particle concentrations in order to withdraw a bio-dissolution pattern. To this end, the absorbance spectra obtained from each assay were arranged in a 3-way data set (colloidal nontronite concentrations, NAu-1 / NAu-2 ratio, and absorbance spectra of ferrospectral-Fe complex) and decomposed with the CP method. This approach allows singling the spectrum of interest out from the important absorbance background noise resulting from the different components present in the media and their respective interactions. Thus, the decomposition with 6 components led to the extraction of the mixture coefficients a_f and b_f related to the contribution of the ferrospectral-Fe complex signal to the global absorbance signal at any nontronite concentration and at any $[NAu-1] / [NAu-1] + [NAu-2]$ ratio respectively. The iron release pattern from NAu-1 and NAu-2 during the incubation with *P.*

aeruginosa-WT, are presented in Figure 2. The Fe release pattern a_f as the function of particle concentration at any NAu-1 / NAu-2 ratio increased with the particles concentration indicating that the variation NAu-1 / NAu-2 ratio didn't affect the partition of the different Fe fractions (soluble, adsorbed and precipitated) in accordance with our previous observation (Fig. 1A). This result suggests the interaction between NAu-1 and NAu-2 (*i.e.* aggregation, mixed layering), if any, did not interfere with the release of Fe in the presence of *P. aeruginosa*-WT. The decrease of b_f as the function of NAu-1 / NAu-2 ratio at any particle concentration indicates that structural Fe(III) is more easily released from NAu-2 than NAu-1. This results infers that the structural Fe(III) of NAu-2 to be more bioavailable.

Secretion of chelating agents:

As shown previously, bacteria can close the concentration gap between mineral solubility and Fe requirement by solubilizing partially iron containing minerals. This process can be achieved by lowering the external pH and / or by the excretion of ubiquitous low molecular weight organic acids such as oxalate able to solubilize and chelate iron (4). The analyses of the culture media during the incubation time revealed the presence of oxalate, methanoate and acetate (Fig. 3).

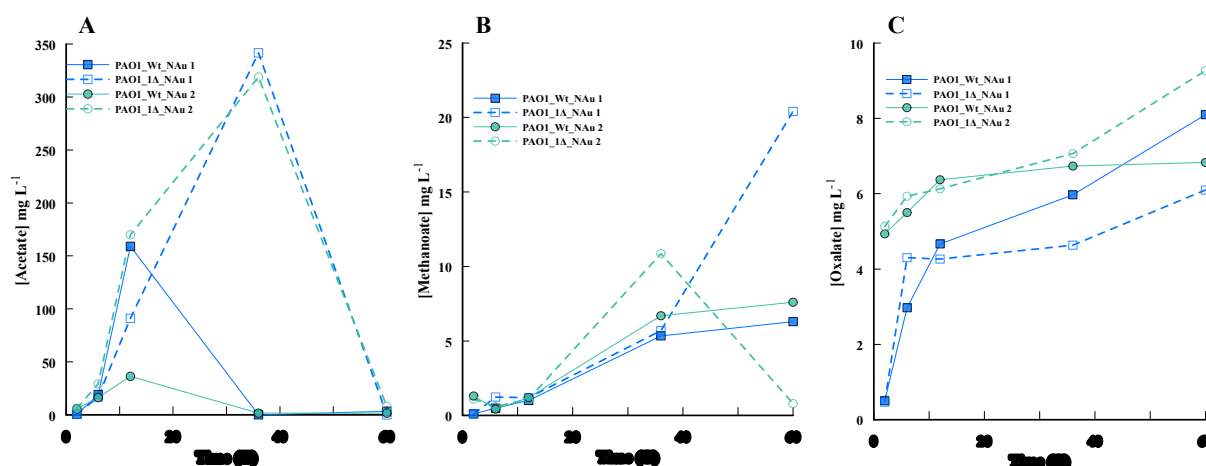


Figure 3: Acetate (A), methanoate (B) and oxalate (C) production by PAO1-WT (filled symbols) and PAO1-1 Δ (empty symbols) in a media containing NAu 1 (squares) and NAu 2 (circles).

Acetate was the main organic molecule released, up to 300 mg L⁻¹, while less than 10 mg L⁻¹ of oxalate were present in the media. The results point out that the same low molecular weight organic molecules were produced by the *P. aeruginosa* WT and *P. aeruginosa* Δ *pvdA* regardless the crystallographic structure of nontronite (NAu-1 *versus* NAu-2). Therefore, the solubilisation of iron cannot be attributed to the production of these organic molecules as any Fe was detected in the assays run with *P. aeruginosa* Δ *pvdA*. However, oxalic acid could play a role in the dissolution process in the presence of siderophores. Indeed, it has been proposed that oxalate act in conjunction with siderophore and such synergic effect facilitate the dissolution of Fe from sparingly soluble minerals (17) (18).

Alternative biological strategy of Fe acquisition needed for their metabolism is the production and excretion of siderophores agents. The production of pyoverdine by *P. aeruginosa* was measured in the 25 independent assays. As an example, figure 3A and 3B display pyoverdine production profile when the assays were run with a constant nontronite ratio (100% of NAu-2 with $[\text{NAu-1}]/[\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}] = 0\%$) across a range of particle concentration (0 to 2.6 g L⁻¹) and with a constant particle concentration (*i.e.* 2.6 g L⁻¹) while varying NAu-1 and NAu-2 ratio (*i.e.* $0 \leq [\text{NAu-1}]/[\text{NAu-1}] + [\text{NAu-2}] \leq 100\%$) respectively. The higher pyoverdine production level ($20 \pm 1.29 \mu\text{M}$) is observed in the assays run without Fe (no added mineral) (Fig. 4A).

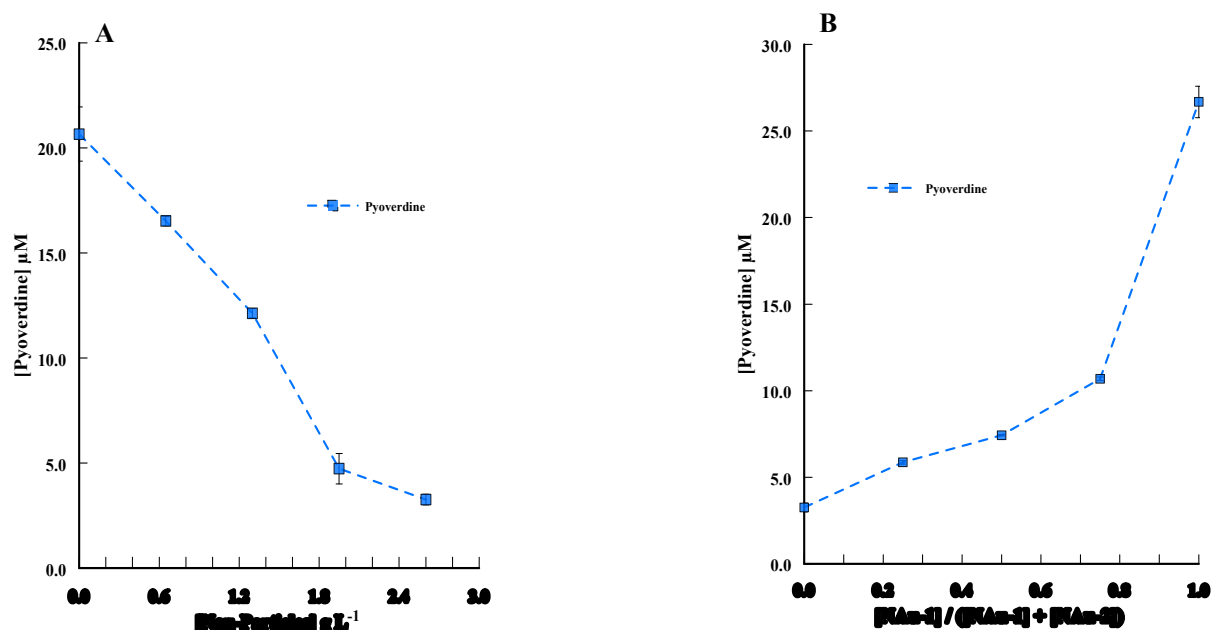


Figure 4: Pyoverdine production in a system, where NAu-1 and NAu-2 ratio are varied across a range of particles concentration, after 24 H of incubation. (A) Pyoverdine production in assays where the NAu-1 and NAu-2 ratio is kept constant ($[NAu-1] / ([NAu-1] + [NAu-2]) = 0$) while the particle concentration is varied. (B) Pyoverdine production in assays where the particle concentration is kept constant (2.6 g L^{-1}) with different NAu-1 and NAu-2 ratio. Errors bars depict the standard deviation of the mean.

On the contrary, a decrease of about 88 % is observed for the higher particle concentration (*i.e.* 2.6 g L^{-1}) showing that pyoverdine secretion is related to Fe deficient conditions. The assays run with different NAu-1 / NAu-2 ratio indicated that the concentration of pyoverdine reached $26.26 \pm 0.91 \text{ } \mu\text{M}$ in the presence of 100 % of NAu-1 (Fig. 4B). On the contrary, this concentration was 8 fold less when the Fe source was 100 % of NAu-2. Pyoverdine secretion and Fe release (Fig. 1) profiles were similar, thus supporting the critical role played by pyoverdine during the mobilization of structural Fe(III) as reported previously (20). Additionally, the larger concentration of pyoverdine was measured when 100% of NAu-1 was used as the sole source of Fe. This result was in agreement with our previous observation (Fig. 1) and supported fully our hypothesis that the structural Fe(III) of Nau-2 was more bio-available in comparison to Nau-1.

The absence of dissolved Fe in the culture medium when the experiments were run with *P. aeruginosa* $\Delta pvdA$ and the fact that the same organic acids were produced by the mutant and the wild type cells indicated clearly that the presence of pyochelin and organic acid alone was not sufficient to dissolve Fe(III) from nontronite embedded in a silica matrix. Although Fe release was observed in the presence of pyoverdine (Fig 1. and Fig. 4), our results did not allow to conclude if the observed dissolution was only due to pyoverdine or to the synergic action of pyoverdine, pyochelin and organic acid.

Similar to our approach developed for the analysis of the global profile of Fe release, the absorbance spectra obtained from each assay were arranged in a 3-way data set (colloidal nontronite concentrations, NAu-1 / NAu-2 ratio, and absorbance spectra of pyoverdine) from which the pyoverdine secretion pattern can be described after CP decomposition. The decomposition led to the extraction of the mixture coefficients a_f and b_f related to the contribution of the pyoverdine signal to the global absorbance signal at any nontronite concentration and at any $[NAu-1] / [NAu-1] + [NAu-2]$ ratio, respectively (Fig. 5).

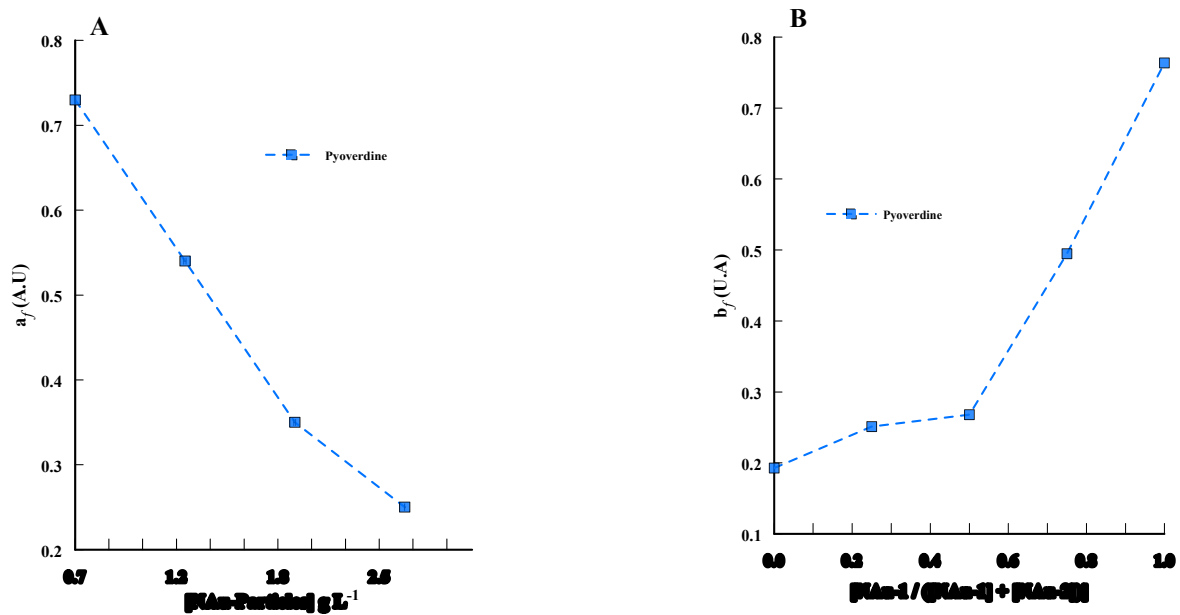


Figure 5: The pattern of pyoverdine production determined after CP decomposition of the 3-way data set. (A) Qualitatif behavior of pyoverdine production as a function of all ratio tested ($1 \geq [NAu-1] / ([NAu-1] + [NAu-2]) \geq 0$) over a range of particle concentration. (B) Qualitatif behavior of pyoverdine production as a function of all particle concentration tested (0 to 2.6 g L⁻¹) over a range of NAu-1 and NAu-2 ratio. Errors bars depict the standard deviation of the mean.

The pyoverdine production profile a_f as the function of particle concentration at any NAu-1 / NAu-2 ratio decreased with particle concentration (Fig. 5A). The pattern of pyoverdine secretion b_f for the different NAu-1 / NAu-2 ratio tested at any particle concentration indicated a slight increase in the range of 100% to 50% of NAu-2 and a sharp rise, with the highest production in the presence of 100% of NAu-1 (Fig. 5A). Even if the CP analysis was qualitative, it allowed to illustrate the general profile of pyoverdine secretion in which the combined effect of both particle concentration and NAu-1 / NAu-2 ratio variation were taken into account. Overall these results suggested that the mixing of NAu-1 and NAu-2 at different ratio didn't affect the pyoverdine production profile due to a combined effect between the two minerals that could have been different from the sum of the individual effect. Furthermore, the highest production and excretion of pyoverdine in the presence of 100 % of NAu-1 implies the structural Fe(III) of NAu-2 is more bioavailable.

Effect of physical contact on Fe acquisition:

To test whether a direct contact would alleviate the need of pyoverdine, a *bfrB-gfp* gene fusion was constructed in pPB plasmids and introduced into *P. aeruginosa* $\Delta pvdA$. The expression of *bfrB* gene coding for a bacterio-ferritin is induced under iron-replete conditions, therefore the activation of this gene would indicate that the bacteria cells satisfied their metabolic Fe requirement. *P. aeruginosa* $\Delta pvdA:: bfrB-gfp$ was subsequently incubated in direct contact with NAu-1 and NAu-2. The activation of *bfrB* gene was estimated by measuring the expression of *gfp* (green fluorescent protein) after 24H of incubation (Fig. 6) by epifluorescence microscopy.

The bacteria cell aggregate images show an expression of *bfrB* gene in the presence of nontronite, although a higher expression was registered when the experiments were run with NAu-2 (Fig. 6B, Fig. 6C). This reinforced our previous observations (Fig.1, Fig. 4) that the bioavailability of Fe is controlled by the crystallography of the mineral. Furthermore, *P. aeruginosa* $\Delta pvdA:: bfrB-gfp$, a strain unable to synthesize pyoverdine was able to acquire Fe, which was not readily available for biological uptake, when a physical contact was established with the mineral.

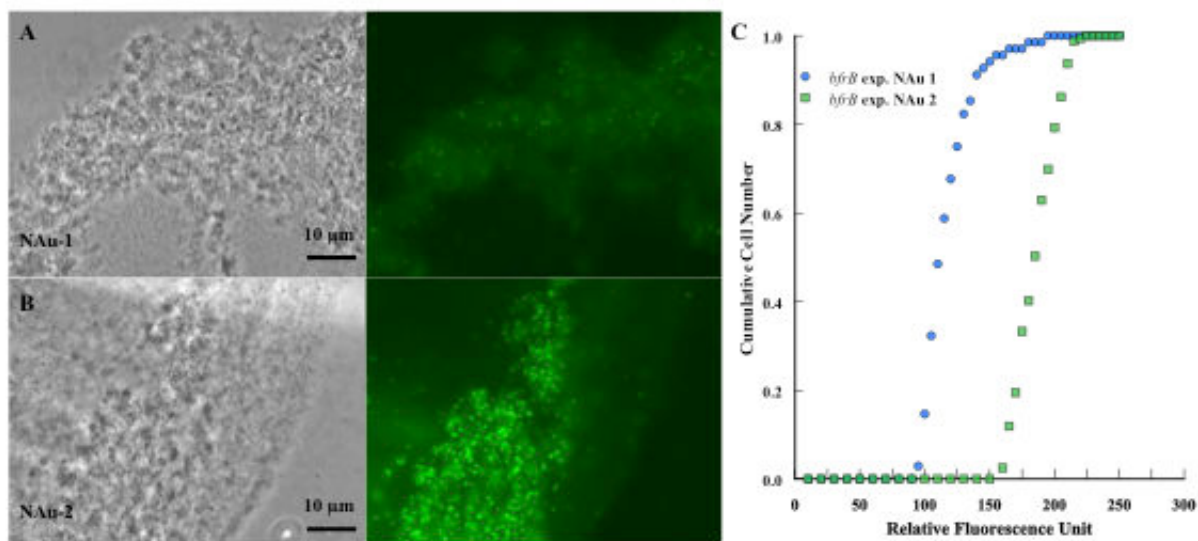


Figure 6: Light microscopy (A, left) and epifluorescence microscopy (A, right) images of NAu-1 in the presence of *P. aeruginosa* 1Δ*pvdA*:: *bfrB*-*gfp*. Light microscopy (B, left) and epifluorescence microscopy (B, right) images of NAu-2 in the presence of *P. aeruginosa* 1Δ*pvdA*:: *bfrB*-*gfp*. The expression of *bfrB* is quantified by measuring the fluorescence intensity of *gfp* emitted by the bacteria cells in contact with of Nau-1 (blue circles) and NAu-2 (green squares). The cell counts was $n = 63$ and $N = 159$ for Nau-1 and Nau-2 respectively.

Previous work with a siderophore deficient *Pseudomonas mendocina* strain (mutation within the locus Pmen 2871, *pmhA*) resulted in similar observations. The mutant strain was unable to acquire Fe from iron containing minerals without a physical contact (18), (16), (19). However, the incubation of siderophore deficient mutant, *P. mendocina* *ymp* in the vicinity of the mineral led to the bio acquisition of Fe from the mineral phase, indicating that another metabolic strategy for iron uptake could be activated to alleviate the absence of siderophore. Indeed, Dehner and co-workers have demonstrated that *Pseudomonas mendocina* was able to reduce and withdraw Fe(III) from montmorillonite, an iron containing clay mineral *via* a cell-associated enzyme. Similarly, *P. aeruginosa* 1Δ*pvdA* could use a reduction-promoted Fe acquisition when the cells were in direct contact with Fe bearing minerals.

Conclusion

P. aeruginosa is capable to acquire structural Fe(III) of a clay mineral, nontronite, through the use of siderophores even if there is a physical barrier between the cells and the mineral particles. Furthermore, the mixing of Nau-1 and NAu-2 didn't affect neither the release of Fe(III) nor the production of siderophore indicating the absence of interaction between Nau-1 and NAu-2 as shown by our multi-parametric experimental approach coupled to CP spectral decomposition. Although *P. aeruginosa* produce and excreted two main siderophores, pyoverdine and pyochelin, it appears that pyoverdine is the key organic molecule involved in Fe solubilisation while the role played by pyochelin is still under investigation. *P. aeruginosa* 1Δ*pvdA*, unable to produce pyoverdine, is able to uptake Fe from nontronite only if a physical contact between the bacterial cells and the mineral is established. The mechanism of Fe acquisition is likely a reduction promoted solubilisation. Structural Fe (III) of NAu-2 seems to be more bioavailable when compared to structural Fe(III) of NAu-1 independently of the Fe acquisition pathway (*i.e.* pyoverdine or reduction promoted Fe acquisition). Thus, the bioavailability of structural Fe(III) is governed by the crystallochemistry of the mineral. The Fe(III) present in the tetrahedron sites seems to be more bioavailable than those located in the octahedron sites. This observation leads to questions how the crystal chemical environment of Fe(III)

(tetrahedron, octahedron) constrain the release of Fe and how siderophores interact with these sites. These questions need to be further explored and are subject of on-going research.

Reference

1. Andrews, S. C., Robinson, A.K., Rodriguez-Quinones (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Review* 27:215–237.
2. Cornell RM, Schwertmann U (2003) *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses* (VCH, Weinheim, Germany).
3. Banwart, S., Davies, S., Stumm, W (1989) The Role of Oxalate in Accelerating the Reductive Dissolution of Hematite (Fe₂O₃) by Ascorbate. *Colloids and Surfaces* 39:303–309.
4. Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C., Mustin, C. (2010) Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74:5478–5493.
5. Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., Bestervelt, L. L. (2013) Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology* 53:303–317.
6. Powel, P.E., Cline, G. R., Reid, C.P P., Szanizol, P. J. (1980) Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* 287:833–834.
7. Schalk, I. J., Guillon, L. (2013) Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental Microbiology* 15:1661–1673.
8. Hider, R. C., Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Natural product report* 27:637–657.
9. Cox, C. D., Rinehart, K. L., Moore, M. L., Cook, J. C. (1981) Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Science* 78:4556–4260.
10. Brandel, J. et al. (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Transaction* 41:2820–2834.
11. Demange, P. et al. (1990) Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins PaA, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biology of Metals* 3:155–170.
12. Albrecht-Gary, A. M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z., Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdin PaA, a peptidic siderophore of 328 *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry* 33:6391–6402.
13. Albrecht-Gary, A. M., Crumblis, A. L. (1998) Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Metal Ions Biology System* 35:239–327.
14. Cheah, S. F., Kraemer, S. M., Cervini-Silva, J., Sposito, G. (2003) Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. *Chemical Geology* 198:63–75.
15. Kraemer, S. M. et al. (1999) Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63:3003–3008.
16. Dehner, C. A., Barton, L., Maurice, P. A., Dubois, J. L. (2011) Size-dependent bioavailability of hematite (Fe₂O₃) nanoparticles to a common aerobic bacterium. *Environmental Science and Technology* 45.
17. Kraemer, S. M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Science* 66:3–18.
18. Dehner, C. A., Awaya, J. D., Maurice, P. A., Dubois, J. L. (2010) Roles of Siderophores, Oxalate, and Ascorbate in Mobilization of Iron from Hematite by the Aerobic Bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Applied Environmental Microbiology* 76:2041–2048.
19. Kuhn, K. M., Dubois, J. L., Maurice, P. A. (2013) Strategies of aerobic microbial Fe acquisition from Fe-bearing montmorillonite clay. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 117:191–202.
20. Ferret, C. et al. (2014) Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology Reports* 6:459–467.
21. Haack, E. A., Johnston, C. T., Maurice, P. A. (2008) Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe³⁺. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72:3381–3397.

22. Ochsner, U.A., Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Vasil, M.L. (2002) GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine synthesis genes. *Molecular Microbiology* 45:1277–1287.
23. Visca, P. et al. (1992) Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Applied Environmental Microbiology* 58:2886–2893.
24. Michot, L. J. et al. (2008) Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the I/N transition. *Langmuir* 24:3127–3139.
25. Grybos, M. et al. (2011) Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. *Journal of colloid and interface science* 262:317–324.
26. Grybos, M., Michot, L. J., Skiba, M., Billard, P., Mustin, C. (2010) Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. *Journal of colloid and interface science* 343:433–438.
27. Oulkadi, D. et al. (2014) Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels. *FEMS Microbiology Letter* 354:37–45.
28. Meyer, J. M., Abdallah, M.A. (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of Gene Microbiology* 107:319–328.
29. Parrello, D., Mustin, C., Brie, D., Miron, S., Billard, P. Multicolor whole-cell bacterial sensing using a joint synchronous fluorescence spectroscopy – Candecomp/Parafac-based approach.

Chapitre 3 : Recherche de gènes « minéral-sensitive » – Approche multiparamétrique par criblage de banques

Après avoir démontré les possibilités offertes par le couplage entre biosenseurs multicolores et algorithmes de traitements du signal pour le monitoring environnemental, le dernier objectif de la thèse est d'identifier un ensemble de promoteurs sensibles à la texture (composition, structure, distribution) d'un environnement minéral particulier ; L'idée *in fine* est de repérer à partir d'un crible ad hoc, une combinaison de promoteurs « ingénierables » réagissant à un large spectre de stimuli environnementaux, afin de développer des senseurs pour le monitoring de la qualité des sols (e.g. indiquant la disponibilité ou l'accessibilité d'oligoéléments essentiels). Il est aussi envisageable que certains des promoteurs identifiés soient impliqués directement ou indirectement dans la mobilisation et la lixiviation de certains éléments essentiels et constitutifs des minéraux des sols.

Dans le projet ANR HÆSPRI, la recherche de gènes "minéral sensitive" était initialement prévue par une étape de mutagenèse aléatoire sur des souches disponibles au laboratoire (*Burkholderia sp G5*, *Rahnella aquatilis RA1*, *Pantoea agglomerans PA1*), isolées de sols lorrains et connues pour leur aptitude à altérer les minéraux silicatés et les phyllosilicates : micas (biotite, phlogopite) et smectites ferrifères. D'après des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Balland et al., 2010; Grybos et al., 2011, Oulkadi 2014), ces souches bactériennes altèrent les silicates en produisant des protons et des acides organiques faibles (gluconate, citrate, oxalate...), voire pour au moins l'une d'entre-elle des sidérophores de type catécholate ou hydroxamate.

Le criblage fonctionnel des capacités altérantes des clones mutants devait être réalisé sur des gels de silice hybride (GSH) plus ou moins dopés en particules de smectites (nontronite ou montmorillonite). Dans son travail de thèse, D. Oulkadi (2013) avait démontré que pour ces souches, l'excrétion de sidérophores ou la production de protons initiait l'altération des GSH avant d'être rapidement relayée par l'excrétion de métabolites acidifiant et complexant.

Or dans ce travail, les banques de mutants réalisées par insertion d'un transposon Tn5-gfp dans le chromosome d'une souche productrice de sidérophores, *R. aquatilis RA1*, ont fourni des résultats contradictoires. L'altération des smectites contenues dans les GSH n'était pas uniquement dépendante de la production de sidérophores. L'explication avancée par D. Oulkadi, est que ce sont des combinaisons multiples plus ou moins synergiques entre excrétion de protons au voisinage des surfaces minérales, les productions génériques d'acides organiques (complexant et acidifiant) et spécifiques de sidérophores qui expliquerait l'efficacité des processus d'altération bioinduits comparativement aux processus abiotiques. Il n'y a donc pas nécessairement de relation univoque entre le niveau d'altération des minéraux et la qualité des agents altérants produits.

Par conséquent, la procédure de mutagenèse aléatoire par insertion chromosomique, jugée trop fastidieuse pour le calendrier du projet ANR et incertaine sur le plan scientifique a été abandonnée et remplacée par une recherche de gènes « mineral sensitive » à partir d'une collection de promoteurs disponibles et répertoriés chez *E. coli* K12 (Zaslaver et al. ;2006). Chaque promoteur est fusionné à un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente à

maturation rapide de type GFP (*GFP_Mut2*). La réponse de ces senseurs fluorescents indiquant l'activité des promoteurs a été évaluée de manière différentielle à l'aide de cribles automatisés réalisés en présence ou non de phases minérales ou organisées (gels de silice).

1. Séquençage haut-débit et transcriptomique vs. criblage de banques

Aujourd'hui, la plupart des études de l'activité transcriptionnelle d'une cellule repose principalement sur deux approches utilisant soit l'hybridation sur des micropuces à ADN (DNA microarray) ou le séquençage d'ARN (ARN-seq). Ces méthodes très performantes ne permettent pas des approches multi-paramétriques.

1.1. Les méthodes en vogue

Micropuces à ADN. Dans les micro-puces à ADN permettant de quantifier l'expression des gènes en une seule expérience, des milliers de sondes oligonucléotidiques sont déposées sur une surface en verre ou une membrane (Figure 44) (Trevino et al. 2007, Ying & Sarwal 2009). Ces sondes sont composées soit d'ADN simple brin complémentaire de séquences d'ARN messagers (ARNm) d'intérêts, soit de petits fragments d'oligonucléotides (20 - 60 nucléotides) synthétisés *in situ*. Les ARNm extraits d'un échantillon biologique sont marqués par un colorant fluorescent (*e.g. Cyanine 3, Cyanine 5*) puis hybridés avec les sondes. La complémentarité entre les oligonucléotides d'un échantillon avec ceux déposés sur la puce est révélée par un quenching de fluorescence. Après élimination des hybridations non-spécifiques par rinçage, la fluorescence de la surface d'hybridation est imagée par excitation laser. L'image de fluorescence obtenue est ensuite traitée afin d'identifier les signaux d'intérêts, leur répartition, leur intensité et de soustraire le bruit de fond. Pour faciliter la comparaison entre les expériences et compenser les erreurs liées à l'utilisation de différentes méthodes de marquage, d'hybridation ou de détection, une étape de normalisation des données est généralement réalisée. Les signaux sont proportionnels à la quantité d'oligonucléotides hybridés.

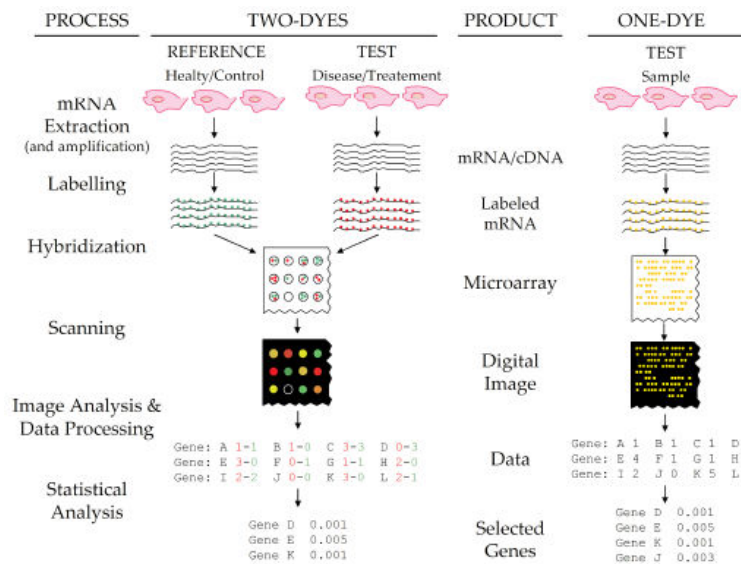


Figure 44 : Les différentes étapes d'une analyse par micropuce à ADN (d'après Trevino et al. 2007)

Séquençage d'ARN. La méthode ARN-seq est basée sur le développement récent des technologies dites de séquençage profond : à l'aide d'algorithmes avancés, une séquence d'ADN complète est reconstituée à partir d'un ou plusieurs fragments (Wang et al. 2009). La Figure 45 résume le processus général d'une analyse ARN-seq. L'ARN extrait (total ou fractionné) est converti en fragment d'ADNc possédant à l'une de leurs extrémités (ou les deux) un adaptateur. Chaque molécule, simple ou double brin, avec ou sans amplification, est alors séquencée par une

méthode haut-débit adaptée. La taille des fragments séquencés varie de 30 à 400 nucléotides selon la technologie utilisée (Illumina, Applied Biosystems SOLiD, Roche 454 Life Science ou encore Helicos Biosciences tSMS system). Enfin, chaque fragment est aligné avec un génome référence, des transcripts de références ou assemblé *de novo* sans séquence génomique dans le but d'obtenir une cartographie transcriptionnelle résolue à l'échelle du génome décrivant la structure de transcription et/ou le niveau d'expression de chaque gène. Les principaux avantages de cette méthode sur l'analyse à micropuce sont : (i) détection de transcripts correspondant à des séquences génomiques non répertoriées, (ii) un bruit de fond quasi inexistant (adressage sans ambiguïté des séquences à une région du génome) et (iii) aucune limite de sensibilité (inférieur ou supérieur).

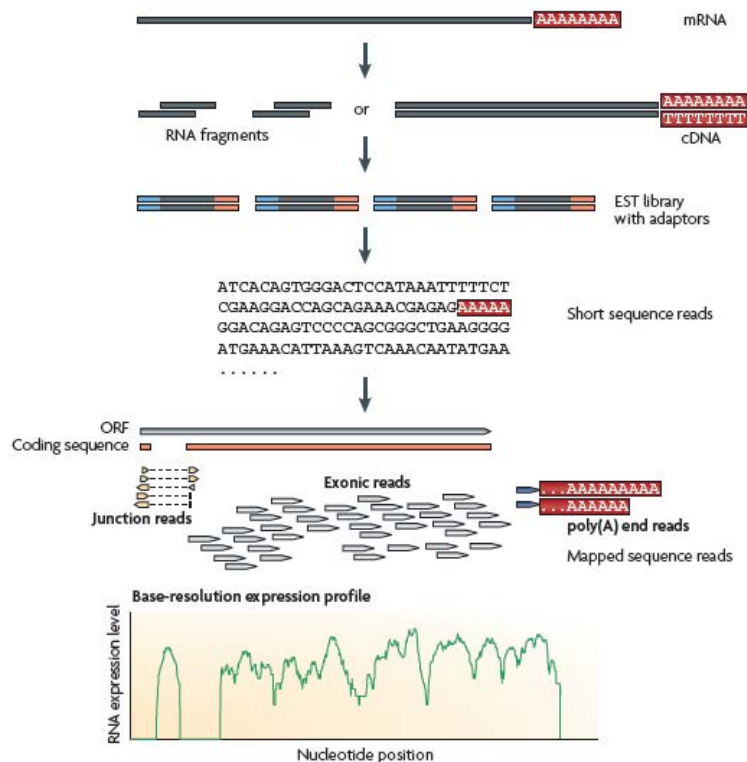


Figure 45 : Processus général d'une analyse ARN-seq (d'après Wang et al. 2009)

Cependant, ces méthodes sont destructives (une analyse = un échantillon) et l'étape préparatoire d'extraction des séquences d'acides nucléiques des échantillons est déterminante. Notamment, la récupération puis la lyse des cellules avant extraction et amplification des fragments d'oligonucléotides, sont des étapes critiques, dont l'efficacité (rendements) est matrice-dépendante. C'est une source de biais analytique important pour des échantillons polyphasiques (e.g., sols, roches, matériaux élaborés, suspension ou agrégats organo-minéraux...) lorsque des protocoles sont appliqués en routine sans tenir compte de la diversité texturale des échantillons d'origine. Très souvent les critères d'échantillonnage, i.e. les volumes et masses de l'échantillon initial, ne sont pas calibrés. Enfin, ces techniques sont particulièrement lourdes et onéreuses à mettre en place, notamment lorsqu'elles sont appliquées à l'échelle de la cellule unique ou pour la réalisation d'une cinétique d'expression. De plus, même si leur précision et sensibilité sont impressionnantes, les masses de données qu'elles génèrent les rendent pour l'instant, quasi-inapplicables dans des plans d'expériences multiparamétriques, mêmes simples, comme ceux que nous avons utilisés ici.

1.2. Le choix du criblage chez *E. coli* K12 MG1655

Face à cette impasse technique, une approche plus pragmatique a donc été développée, en utilisant une banque de biosenseurs fluorescents à cellules entières construit par insertion chez *E. coli* K12 de plasmides « low-copy » associant sur une même origine de transcription un promoteur spécifique à un gène rapporteur *gfpmut2* codant une protéine fluorescente de type GFP. L'analyse de la fluorescence cellulaire induite dans un environnement donné, donne une indication semi-quantitative de l'activité transcriptionnelle des promoteurs. Cette collection de promoteurs « fluorescents » développée par Zaslaver *et al.* en 2006 pour *Escherichia Coli* K12 MG1655 est la plus complète à ce jour. Elle propose 1812 clones fluorescents représentant 75% des promoteurs d'*E.coli*, répartis sur 21 microplaques (Cf matériel et méthodes, § 9).

Une collection suffisamment étendue n'existant pas pour *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, une recherche exhaustive de gènes d'intérêts, inductible par le minéral (mineral responsive), ne pouvait être réalisée, par conséquent, que chez *E. coli*.

L'entérobactérie *E.coli* K12 n'est probablement pas la souche modèle la mieux adaptée pour étudier les interactions bactérie-minéral dans les sols mais son génome est largement documenté. Le rôle et les séquences de nombreux promoteurs sont connus, ce qui facilite la construction de collections de biosenseurs fluorescents.

Les promoteurs homologues à ceux « mineral responsive » repérés chez *E. coli* K12 pourront être ensuite recherchés dans des souches bactériennes modèles (*Pseudomonas*, *Burkoldheria*, ...) isolées à partir de sols naturels. Les souches compétentes seront alors génétiquement modifiées afin d'y incorporer des systèmes « rapporteurs » identifiables par les méthodes mathématiques de décompositions tensorielles (Candecomp/Parafac CP) décrites dans le Chapitre I.

2. Criblage de la collection de promoteurs chez *E. coli* K12 MG1655

A partir du protocole décrit dans la section « Matériels et Méthodes », l'activité des promoteurs d'*E.coli* K12 MG1655 a été évaluée selon 4 modalités :

- MOPS : Milieu MOPS seul
- GS : Milieu MOPS + Gel de silice pur (sans minéraux)
- NAu-2 : Milieu MOPS + Suspension colloïdale de nontronite NAu-2 (T2)
- GSH : Milieu MOPS + Gel de silice dopé en nontronite NAu-2 (GS+ NAu-2)

Le milieu MOPS est un milieu minimum non fluorescent et peu complexant assurant un développement non optimal mais satisfaisant de la souche *E.coli* K12 MG1665. Son utilisation réduit le fond de fluorescence lors des mesures spectrales, évitant ainsi une surestimation des réponses des transcriptionnelles des clones comme dans un milieu LB. Dans le MOPS, le temps de génération moyen de *E. coli* K12 a été estimé 2 à 3 heures avec une phase de latence comprise entre 1 et 3 heures. Ces temps sont relativement longs par rapport à ceux mesurés sur milieu LB, ce qui impose des temps d'incubation entre 15h et 24 h pour avoir une réponse optimale à partir d'inoculum suffisamment dilués (10^7 bact/ml ; $OD_{600nm} < 0,1$). En général, en fin d'incubation, la densité optique (OD_{600nm}) est comprise entre 0,4 et 0,7.

La seconde modalité GS permet d'étudier l'impact d'une structure poreuse et siliceuse, simulant la matrice d'un sol, sur l'activité des promoteurs d'intérêts. En effet, il est envisageable que certains promoteurs puissent réagir à la présence de supports microporeux hydrophiles et chargés négativement, comme les éléments siliceux rencontrés dans certains sols.

La troisième modalité NAu-2 vise une estimation des réponses cellulaires à la présence d'une suspension de particules colloïdales riches en fer (feuillet de Nontronite NAu-2). Comme il a été montré au chapitre II avec la souche PAO1, l'interaction directe feuillet-cellule peut conduire à la formation de biofilm, à la production de sidérophores (pyoverdine) et *in fine* à la solubilisation du fer des nontronites.

Enfin, la quatrième modalité GSH est dédiée à l'étude de l'activité des promoteurs d'intérêts en présence des mêmes particules de nontronite mais immobilisées au sein d'une structure poreuse et siliceuse. Leur dispersion étant colloïdale, y compris au sein du gel, il n'y a aucune interaction directe entre les particules et les cellules microbiennes.

Bien que les résultats obtenus dans le chapitre II indiquent que la cristalochimie de la nontronite influence fortement l'activité microbienne et la solubilisation du fer, la collection de clones a été uniquement testée en présence de la nontronite N Au-2.

3. Pré-traitements des données brutes

Au terme de l'expérience et avant leur analyse, les données brutes de fluorescence déterminées selon le protocole décrit dans la section « Matériels et Méthodes » ont été corrigées et filtrées.

Pour chaque échantillon, seule la moyenne des réplicats techniques est prise en compte : mesures « multi-points » réalisées sur le diamètre de chaque puits. Une série de pré-traitements des données de fluorescence initiale est réalisée et vise : la correction de l'atténuation entre les modalités (facteur d'écrantage), une soustraction du bruit de fond et une normalisation des variations des expressions par rapport aux valeurs moyennes ou médianes.

3.1. Prise en compte de l'écrantage

Les données brutes de fluorescence pour les modalités GS, N Au-2 et GSH ont été corrigées d'un « facteur d'écrantage ».

En effet, la présence des gels de silice ou de micro-particules dans les puits des microplaques diminue l'irradiance des suspensions bactériennes ou le volume d'excitation utile à la mesure de fluorescence. Les cellules bactériennes ne pouvant pas pénétrer dans les gels ou être masqués par des particules en suspension, l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée est alors sous-estimée.

En observant l'émission de GFP au sein d'une microplaque, on constate aussi que les distributions cellulaires ne sont pas identiques entre les modalités MOPS, GS ou N Au-2 (Figure 46). Des spots de croissance ou micro-colonies de bactéries apparaissent en surface des gels. Cette distribution cellulaire particulière est sans doute le résultat de l'agitation, même modérée, des cultures d'*E. coli* sur des gels de silice de forme concave (ménisque résiduel formé lors de la synthèse). La mesure multi-point sur 5 échantillons « lisse » l'effet de cette distribution hétérogène sur la valeur finale.

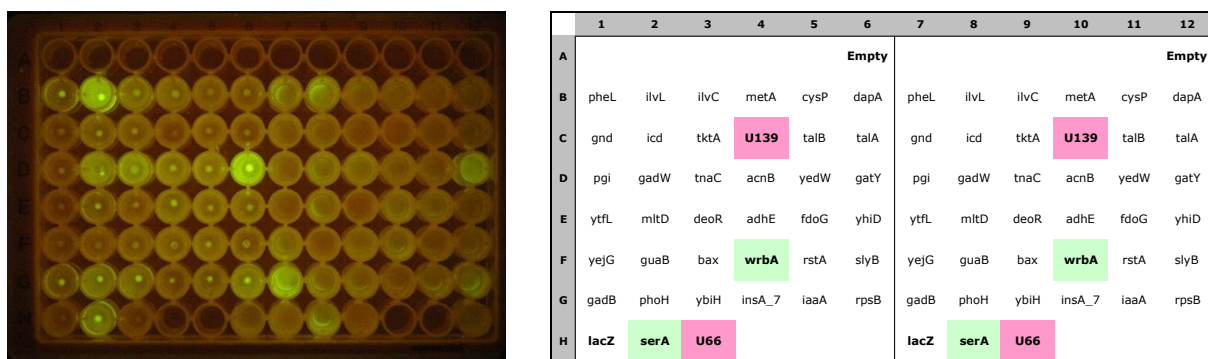


Figure 46 : Visualisation par rétro-éclairage (Ex 480 nm – Em > 530 nm) de la fluorescence d'une sélection de clones, induite en présence de GS (moitié gauche) et du milieu MOPS (moitié droite)

Recherche de gènes « minéral-sensible »

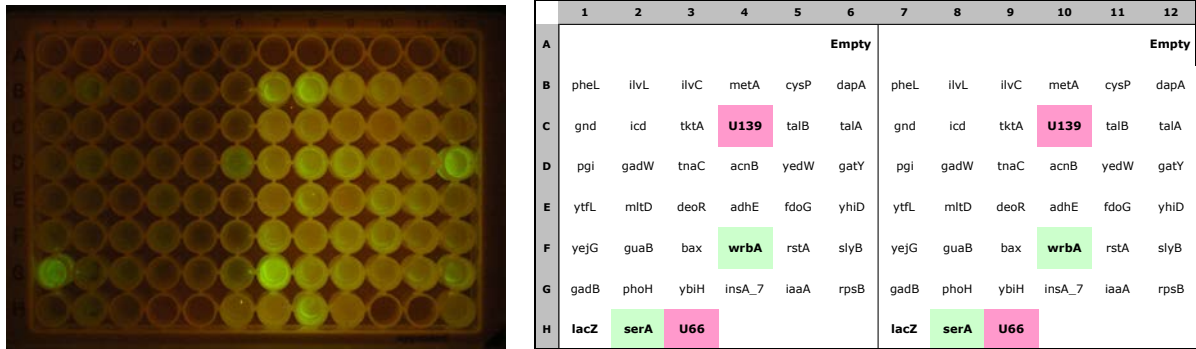


Figure 47 : Visualisation par rétro-éclairage (Ex 480 nm – Em > 530 nm) de la fluorescence d'une sélection de clones, induite en présence de NAu-2 (moitié gauche) et du milieu MOPS (moitié droite)

La mesure d'épi-fluorescence à longueur d'onde fixe de l'expression de la GFP, intègre donc, plusieurs facteurs de variations associés à la fois à la croissance cellulaire des clones et à la géométrie du gel support. Néanmoins, il est possible d'observer des expressions différentielles de quelques promoteurs. Comme le montre la Figure 44, les promoteurs *ilvL*, *gatY*, *gadB* et *phoH* (situés en B2, D12 G1 et G2) sont exprimés différemment en fonction du substrat utilisé, gel de silice, particule minérale de nontronite ou milieu MOPS en l'occurrence.

Malgré tout cette comparaison directe de la fluorescence brute ne tient pas compte de l'effet d'écrantage généré par la présence du gel de silice. Il s'agit pour le moment d'une analyse très relative sur une observation biaisée.

Pour déterminer le facteur d'écrantage, une souche *E. coli* TOP10 *lacZ*::*gfp* exprimant de manière constitutive la GFP a été incubée dans les quatre conditions. Les mesures de fluorescence au maxima d'émission du spectre synchrone (495 nm pour la GFP) ont été réalisées en quadruplets pour deux densités cellulaires ($O.D_{600nm} = 0,5$ et 1) en présence ou non de gels ou de suspensions de nontronite (Figure 48).

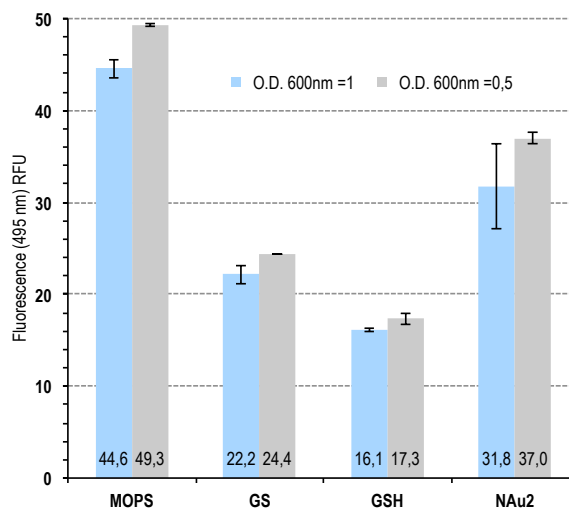


Figure 48 : Détermination de l'atténuation générée par la présence de particules de nontronite NAu-2 (NAu-2) ou de gels de silice (GS – GSH) sur l'émission de fluorescence de la GFP (495 nm), produite de manière constitutive par la souche *E. coli* TOP10 *lacZ*::*gfp*. La mesure est effectuée pour 2 densités cellulaires représentatives des croissances observées sur microplaques.

L'écrantage est très important pour les deux modalités en présence de gels de silice dopés ou non en nontronite. La fluorescence est divisée au moins par 2 dans les deux cas. L'effet d'une suspension colloïdale de feuillets de nontronite est moins rédhibitoire. Ce résultat prouve que les spectres de fluorescence sont aussi perturbés par des phénomènes complexes de réflexion et diffraction du rayonnement au sein du gel. La géométrie (e.g. hauteur) et les propriétés texturales du réseau de silice perturbent l'adsorption des photons incidents et par conséquent diminue le rendement d'émission de fluorescence. En revanche, les variations de l'émission de fluorescence sont relativement faibles et l'atténuation de la fluorescence ne dépend pas de la densité cellulaire.

On obtient ainsi pour chaque modalité, des facteurs de correction exprimés en prenant les mesures réalisées dans le milieu MOPS comme référence (Tableau 16). Avant toute analyse statistique, l'intensité de fluorescence de la GFPmut2 mesurée à 510 nm sera donc corrigée du facteur S_h : $I_{\text{promoteur}} = I_{\text{mesurée}} * S_h$

Tableau 16 : Facteurs de correction moyens (S_h) retenus et appliqués pour l'inter-comparaison des expressions des activités des promoteurs entre modalité.

Modalité ->	MOPS	GS	GSH	NAu-2
Facteur de correction (S_h)	1,0	2,0	2,8	1,4

3.2. Seuillage du bruit de fond

Les données brutes ont été homogénéisées par rapport au bruit de fond, défini par les émissions de fluorescence des clones témoins « sans promoteur » U66 et U139 présents dans chaque microplaque. Dans le milieu MOPS, la valeur moyenne de la fluorescence mesurée à 510 nm à partir de ces 2 x 21 réplicats, est relativement basse (1,31) et a été prise comme référence d'une expression nulle (valeur de bruit de fond). Toutes les valeurs d'émission proches de ce seuil ont été réajustées à zéro, ce qui facilite l'identification des promoteurs non actifs dans les procédures de classification. Ils ne sont plus considérés pour le reste du calcul.

4. Analyse de l'expression différentielle des promoteurs

L'objectif de ce travail est double : l'identification des promoteurs différentiellement exprimés entre les quatre conditions de culture et étudier ceux qui sont « mineral responsive ».

La méthode la plus simple est la fixation d'un seuil arbitraire de fluorescence à partir duquel l'expression d'un promoteur est considérée comme significativement différente entre deux conditions. Ce critère assez facile à employer pour des conditions prises deux à deux, n'est pas pertinent dans le cas d'une approche multi-paramétrique à 4 paramètres (i.e. 4 variables explicatives). Le choix s'est donc porté sur des outils de classification plus élaborés, basés sur l'analyse factorielle ou des méthodes d'agrégation.

Les analyses factorielles dites en composantes principales (ACP) ou discriminantes (AFD) figurent parmi des méthodes d'analyse de données multivariées les plus utilisées, notamment en biologie et écologie. Elles permettent d'appréhender la structure des données et la proximité entre les réponses entre promoteurs ou d'identifier les caractéristiques des groupes formés sur la base de variables explicatives (MOPS, GS, NAu-2 ou GSH).

Toutefois, quels que soient les modèles d'analyse employés linéaires ou quadratiques, sur des jeux de données trop important, l'emploi de ces méthodes se heurte souvent à des problèmes de variance quasi-nulle ou de forte multi-colinéarité entre variables. C'est le cas avec les données de fluorescence obtenues sur l'expression des 1817 promoteurs de la collection, où de nombreux clones ont des réponses peu variantes voire nulles. Ces problèmes sont amplifiés surtout si les situations (e.g. GS, GSH) ne sont pas suffisamment contrastées. Plutôt que d'ignorer ces variables pour l'ensemble des calculs, nous avons préféré utiliser une méthode de classification « k-

means » pour constituer des groupes homogènes de promoteurs (classes) sur la base de leur réponse dans les différentes modalités.

En revanche, l'analyse factorielle sera très utile, dans un second temps, pour expliquer et prédire l'appartenance de promoteurs à plusieurs classes.

4.1. Classification de l'expression des promoteurs avec la méthode « k-means »

Pour cette procédure de tri, nous avons privilégié une méthode d'agrégation autour de centres mobiles, connue sous le nom de « k-means ». Cette méthode repose sur un algorithme itératif qui, à chaque étape, reclasse tout nouvel individu dans des groupes établis en optimisant un critère d'inertie, i.e. minimisation des distances au barycentre dans chaque groupe. Cette procédure est très dépendante du choix du nombre de classes et des centres initiaux des groupes. Pour éviter les biais, le classement est réitéré avec des tirages aléatoires de centre de groupes initiaux, pour ne retenir *in fine* que la classification la plus optimale.

La méthode K-means, à l'inverse de la classification ascendante hiérarchique (CAH), impose de fixer *a priori* le nombre de groupes dans lesquels le classement des promoteurs doit être effectué. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne permet pas de déterminer *a priori* un nombre cohérent de classes, ni de visualiser la proximité entre les classes ou les objets afin d'optimiser les critères de classement.

Ce n'est pas un problème dans le cas présent, car le nombre de groupes est imposé par la question posée : Quels sont les promoteurs exprimés ou inhibés dans l'une ou l'autre des quatre conditions ? Le nombre minimum de classe est par conséquent de 5 : les 4 modalités, plus au moins une classe regroupant les promoteurs invariants ou peu exprimés.

De plus, l'affectation à une classe n'est pas irréversible comme dans la CAH, un promoteur peut changer de classe à chaque itération : à chaque itération, l'algorithme transfère des promoteurs d'un groupe à un autre pour optimiser le critère d'inertie.

Elimination des expressions non significatives.- Une première classification *k-means* a été réalisée sur l'ensemble des données corrigées des facteurs d'écrantage afin de déterminer les groupes de promoteurs dont l'activité était plus particulièrement affectée par l'une ou l'autre des 4 modalités. Seuls les promoteurs présentant des variations significatives positives ou négatives sont conservés par la suite. Pour cela, les valeurs mesurées et corrigées pour chaque promoteur ($I_{\text{promoteur}}^k$ dans la modalité k) ont été recentrées et normées par rapport à la valeur moyenne (ou médiane) des modalités :

$$\Delta_{\text{promoteur}}^k = \frac{I_{\text{promoteur}}^k}{\frac{1}{4} \sum_{k=1}^4 I_{\text{promoteur}}^k} - 1 \quad \text{ou} \quad \Delta_{\text{promoteur}}^k = \frac{I_{\text{promoteur}}^k}{\text{Mediane}(I_{\text{promoteur}}^k)} - 1$$

La médiane est plus robuste et évite d'être trop sensible aux valeurs d'expression extrêmes. Grâce à ce premier tri, les promoteurs peu-sensibles, i.e. non-actifs ou présentant des variations non significatives et faibles, sont éliminés. L'utilisation d'un nombre de classe supérieur à 5 permet d'optimiser la classification. Ainsi, la décomposition de la variance des expressions s'effectue de manière optimale entre les groupes, plutôt que dans chaque groupe (Tableau 17).

Au total, de 1400 à 1600 promoteurs (classe 1 & 3) sont éliminés lors de cette première étape de tri. Ce sont des promoteurs inactifs, comme ceux de contrôle (*lacZ*, *U66* et *U139*) ou exprimés de manière non différentielle comme *wrbA*. Ces classes sont homogènes et peu dispersées (variance intra-classe faible).

On obtient des résultats très similaires en utilisant une normalisation par rapport à la moyenne ou en réduisant le nombre de classe. L'effectif et le contenu des groupes 1&3 varient peu. Les détails des décompositions sont donnés en Annexe. Des essais successifs de classification, permettent de sélectionner entre 220 et 400 promoteurs dont les expressions sont significatives et différentielles en fonction des modalités.

Tableau 17 : Classification de l'expression des activités des promoteurs (sur 10 groupes). La variance intra-classe est exprimée en logarithme décimal. La décomposition de la variance est répartie pour 7,2% dans les classes et pour 92,8% entre les classes.

Groupe ou classe ->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Promoteur centraux	<i>yebG</i>	<i>ymcC</i>	<i>gmk</i>	<i>ytfl</i>	<i>yedW</i>	<i>gadX</i>	<i>yahM</i>	<i>yhiD</i>	<i>tonB</i>	<i>bax</i>
Nombre de promoteurs	1439	12	149	55	23	7	8	25	82	12
Expression différentielle	4,0	1244,2	36,8	194,5	572,1	6874,1	3940,4	346,4	101,5	2051,2
Variance intra-classe (Log)	0,6	3,1	1,6	2,3	2,8	3,8	3,6	2,5	2,0	0,6
Expression	--	+++	-	+	+	++	++	+	+	++
Hétérogénéité	--	++	+	+	++	++	++	+	+	--
Principaux promoteurs représentatifs des groupes	<i>lacZ</i> U139 U66	<i>serA</i> <i>cysK</i> <i>ilvC</i> <i>rstA, cld</i> <i>ybiH yhhM</i> <i>phoH</i>	<i>wrbA</i> <i>argA</i> <i>argC</i> <i>argI</i> <i>cysB</i>	<i>aroK</i> <i>cysP</i> <i>dapA</i> <i>gnd</i> <i>secM</i>	<i>aroL</i> <i>glyA</i> <i>ptsG</i> <i>acnB</i> <i>yedW</i>	<i>hisL</i> <i>pheL</i> <i>mltD</i> <i>adhE, gadX</i> <i>asd, rpsM</i>	<i>ilvL</i> <i>gatY</i> <i>yejG</i> <i>yahM</i> <i>rpsP</i>	<i>metA</i> <i>crp</i> <i>gadW</i> <i>dmsA</i> <i>yrbL</i>	<i>metE</i> <i>metR</i> <i>rpiA</i> <i>serC</i> <i>cyoA</i>	<i>bax</i> <i>clpB</i> <i>gadB</i> <i>sraB</i> <i>ompA</i>

Classification des expressions significatives selon les 4 modalités.- Sur les quelques 300 promoteurs restant, une seconde étape de classification est entreprise afin d'identifier les groupes de promoteurs associés aux modalités. En effet, leur variation d'expression est très importante (Tableau 17). Les groupes sont très hétérogènes : la variance intra-classe indique des variations sur plusieurs ordres de grandeurs.

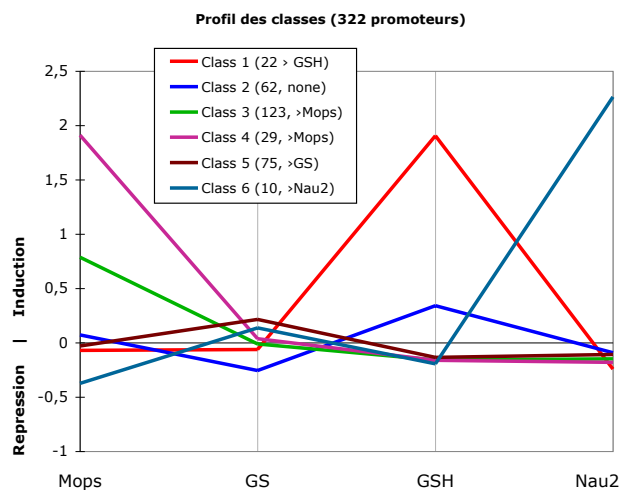


Figure 49 : Classification des niveaux d'induction des promoteurs en fonction des 4 modalités : MOPS (Milieu seul) ; GS (MOPS + Gel de silice pur) ; GSH (MOPS + Gel de silice dopé en nontronite NAu-2) ; NAu-2 (MOPS + suspension colloïdale de nontronite NAu-2)

Comme le montre la classification (Tableau 18) et l'analyse factorielle mis à part le groupe 2, les autres groupes de promoteurs sont activés ou inhibés en présence de particules colloïdales de nontronite ou de gels de silice. On constate néanmoins qu'une partie importante de variabilité des expressions, correspond à une variabilité intra-classe. Les groupes de promoteurs présentent donc de fortes hétérogénéité d'expression que l'on peut appréhender sur les analyses factorielles (Figure 50). L'analyse factorielle permet de mieux discerner les groupes et la proximité entre les réponses des promoteurs ou d'identifier les caractéristiques des groupes formés autour des 4 variables explicatives : MOPS, GS, NAu-2 ou GSH. Seuls quelques promoteurs sont fortement actifs et explicatifs des différentes modalités.

Recherche de gènes « minéral-sensitive »

Tableau 18 Classification optimale de l'expression des activités des promoteurs actifs (6 groupes). La décomposition de la variance est répartie pour 27,5% dans les classes et pour 72,5% entre les classes.

Groupe ou classe ->	1	2	3	4	5	6
Promoteur centraux	<i>xthA</i>	<i>sdhC</i>	<i>sthA</i>	<i>alaS</i>	<i>uspF</i>	<i>yegT</i>
Nombre de promoteurs	22	62	123	29	75	10
Variance intra-classe (Log)	0,7	0,3	0,2	0,4	0,3	0,8
Expression différentielle						
MOPS	0,172	0,041	0,727	1,966	0,076	-0,254
GS	-0,210	-0,259	0,040	0,211	0,283	0,046
GSH	1,890	0,456	-0,148	-0,211	-0,105	-0,046
NAu-2	-0,172	-0,041	-0,040	-0,241	-0,076	2,480
Effet induit par ->						
	GSH	n.d	MOPS	GS	NAu-2	
Principaux promoteurs représentatifs des groupes	<i>adhE</i>	<i>tonB</i>	<i>serA</i>	<i>mltD</i>	<i>cspD</i>	<i>tnaC</i>
	<i>gadX</i>	<i>pitB</i>	<i>gatY</i>	<i>crl</i>	<i>yiaF</i>	<i>yegT</i>
	<i>zntA</i>	<i>ompA</i>	<i>hisL</i>	<i>asd</i>	<i>rmB</i>	<i>yegT</i>
	<i>znuA</i>	<i>ompX</i>	<i>rpsU</i>	<i>pheL</i>	<i>rmB</i>	<i>rpe</i>
			<i>phoH</i>		<i>rpsL</i>	

Une fois cette seconde classification effectuée, les promoteurs de chaque classe ont été ordonnés par rapport à leur variance inter-modalité afin d'identifier les promoteurs dont l'activité est plus modulable et obtenir une sous-collection de promoteurs « *mineral responsive* ». 132 promoteurs furent ainsi sélectionnés et regroupés sur deux microplaques (AZ31 & AZ32), présentées en Annexe IV. Cette sous-collection intègre les promoteurs de contrôle et des promoteurs non actifs identifiés lors de la première étape de classification

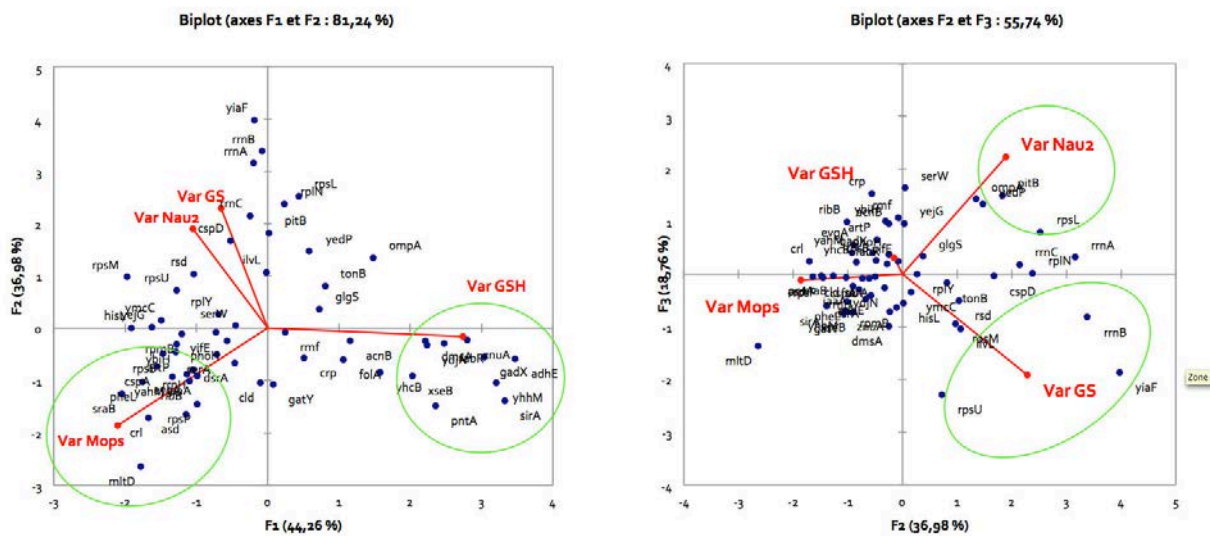


Figure 50 : Analyse en composante principale (ACP) après filtrage K-means des promoteurs les plus sensibles (n=332) sur 4 modalités : MOPS - milieu seul ; NAu-2 - milieu + suspension de colloïdales de nontronite (NAu-2), GS - milieu + gel de silice non dopé, GSH- milieu + gels de silice hybride dopés en nontronite NAu-2.

Afin de valider les promoteurs sélectionnés, une cinétique d'expression a été réalisée selon les 4 mêmes modalités. Les mesures de fluorescence ont été réalisées à t = 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9 et 24h. A partir de ces seconds résultats (présentés en annexe), 35 promoteurs furent confirmés, i.e. dont l'activité était au minimum 5 fois supérieur au bruit de fond et modulée selon les modalités (Tableau 19).

Tableau 19 : Fonctions cellulaires des principaux promoteurs identifiés et aux activités différenciables. Le taux d'identité (similitude) chez *P.aeruginosa* PAO1 est indiqué en %.

Gène	Fonction chez <i>E. coli</i>	Grande fonction cellulaire	Similitude PAO1 (%)	Fonction chez <i>P.aeruginosa</i> PAO1
hisL	his operon leader peptide	synthèse protéique	0	/
ygjG	putative acetylornithine aminotransferase, PLP-dependent (2nd module)	synthèse protéique	38 (55)	bifunctional N-succinylidiaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein
pheL	leader peptide of chorismate mutase-P-prephenate dehydratase	régulation	0	/
ilvL	ilvGEDA operon leader peptide	régulation	0	/
gadW	putative transcriptional regulator (AraC/XylS family) (2nd module)	régulation	32 (58)	putative transcriptional regulator
gatY	tagatose 6-phosphate aldolase 2, subunit with GatZ	énergie	34 (54)	fructose-1,6-bisphosphate aldolase
adhE	multifunctional multimodular AdhE: acetaldehyde-CoA dehydrogenase (1st module)	énergie	29 (48)	iron-containing alcohol dehydrogenase
cfa	cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase (unsaturated-phospholipid methyltransferase) (2nd module)	structure membranaire	41 (57)	hypothetical protein PA5546
gadB	glutamate decarboxylase, PLP-dependent, isozyme beta	structure membranaire	41 (57)	Hypothetical protein
phoH	PhoB-dependent, ATP-binding pho regulon component (2nd module)	énergie	45 (60)	Hypothetical protein
rpsB	30S ribosomal subunit protein S2	synthèse protéique	74 (85)	30S ribosomal protein S2
aroL	shikimate kinase II	synthèse protéique	35 (54)	shikimate kinase
msrB	putative methionine sulfoxide reductase/regulator	régulation	53 (69)	methionine sulfoxide reductase B
tnaC	tryptophanase leader peptide	régulation	44 (75)	hypothetical protein PA2604
hslV	peptidase component of the HslUV protease	synthèse protéique	72 (84)	ATP-dependent protease peptidase subunit
ybiH	putative transcriptional represor (TetR/AcrR family)	régulation	30 (44)	transcriptional regulator
iaaA	putative asparaginase	synthèse protéique / énergie	31 (44)	nitrate reductase catalytic subunit
yahM	unknown CDS	inconnue	33 (43)	dimethylglycine catabolism protein DgcB
gadX	putative transcriptional regulator (AraC/XylS family)	régulation	22 (39)	putative transcriptional regulator
ycbK	conserved hypothetical protein	inconnue	57 (66)	ferrous iron transport protein B
evgA	response regulator (activator) in two-component regulatory system with EvgS, regulates multidrug resistance (LuxR/UhpA family)	régulation	39 (61)	two-component response regulator
ymcC	putative synthetase	transporter	38 (48)	putative two-component sensor
asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase, NAD(P)-binding (1st module)	synthèse protéique	0	/
ompA	outer membrane protein 3a (II*;G;d) (2nd module)	transporter	40 (56)	lipotoxon F LptF
cld	regulator of length of O-antigen component of lipopolysaccharide chains	structure membranaire	0	/
dsrA	anti-sense RNA, silencer of rcsA gene, interact with rpoS translation	régulation	63 (68)	hypothetical protein OU9_05230
rpsM	30S ribosomal subunit protein S13	synthèse protéique	75 (87)	30S ribosomal protein S13
rpsJ	30S ribosomal subunit protein S10	synthèse protéique	90 (98)	30S ribosomal protein S10
rpmB	50S ribosomal subunit protein L28	synthèse protéique	82 (89)	50S ribosomal protein L28
rplY	50S ribosomal subunit protein L25	synthèse protéique	39 (60)	50S ribosomal protein L25
rrnH	16S rRNA	synthèse protéique	0	/
rsd	regulator of sigma D, has binding activity to the major sigma subunit of RNAP	régulation	0	/
rrnC	16S rRNA	synthèse protéique	0	/
rrnD	16S rRNA	synthèse protéique	0	/
ompC	outer membrane protein 1b (ib;c), porin (1st module)	transporter	31 (50)	Ferrioxamine receptor FoxA

Près de 80% des promoteurs d'intérêts sont rattachés aux grandes fonctions cellulaires : la synthèse protéique (39%), la régulation de l'expression génétique (28%), le métabolisme énergétique (11%). Les 20% restant sont affiliés à la structure et à la dynamique de la membrane : *membrane shape* (8 promoteurs), transporteurs (8 promoteurs). Deux promoteurs (*yahM* et *ycbK*) contrôlent l'expression de gènes aux rôles inconnus.

Les séquences nucléotiques des gènes contrôlés par les promoteurs d'intérêts ont été alignées avec le génome de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 à l'aide du programme blastx qui traduit la séquence ADN d'entrée en séquence d'acides aminés pour ensuite l'aligner avec les séquences protéiques connues ou prédites de l'organisme d'intérêt. L'intérêt de ce programme étant de s'astreindre du biais engendré par le biais d'usage des codons d'un organisme à l'autre.

5. Evaluation des biais méthodologiques sur les promoteurs sélectionnés

Au travers d'une démarche critique, nous nous sommes intéressés à trois aspects clés de l'expérience susceptible d'introduire des biais dans l'évaluation de l'activité différentielle de promoteurs.

En partant du principe que la GFP, une fois produite, s'accumulait et était stable 24h, les mesures de fluorescence n'ont été réalisées qu'à un seul temps : $t = 18h$. La Figure 51A présente la cinétique d'activité dans le milieu Mops de quatre promoteurs issus de la sous-collection.

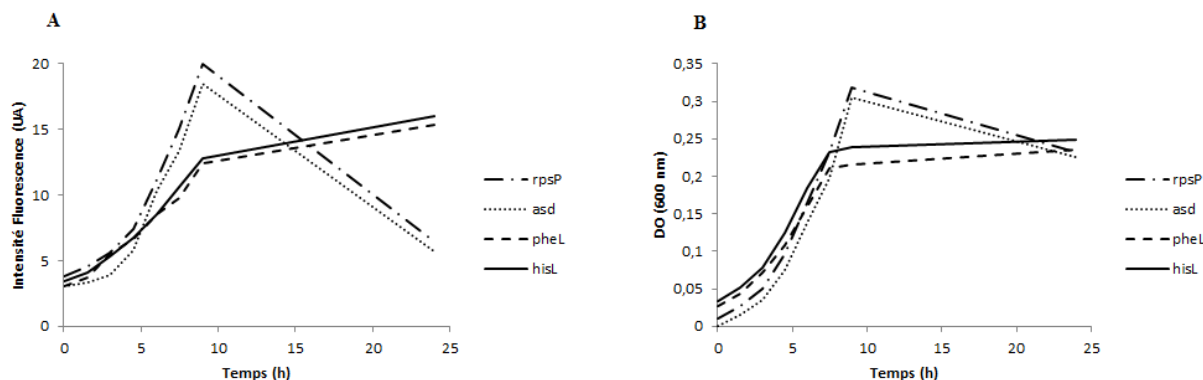


Figure 51 : A- Cinétique d'activité des promoteurs *rpsP*, *asd*, *pheL* et *hisL* dans le milieu MOPS seul. B- Courbe de croissance moyenne des quatre *E.coli* K12 MG1655 correspondantes. ($n = 3$).

Tandis que l'activité des promoteurs *pheL* et *hisL* se comporte selon notre hypothèse (*i.e.* phase d'induction suivi d'une phase stationnaire), celle des promoteurs *rpsP* et *asd* va à son encontre. Le suivi parallèle de la DO_{600} (Figure 51B) confirme que ce n'est pas un problème de mort cellulaire. Il faut alors considérer le fait que notre temps de mesure n'est pas optimal pour l'ensemble des promoteurs testés et qu'il est probable que nous soyons passés à côté de certains promoteurs dont l'activité était significative à des temps inférieurs.

Dans un second temps, nous avons souhaité nous assurer du fait que la mesure de fluorescence était bien représentative de l'activité du promoteur étudié à l'échelle de la *single-cell*. En d'autres termes, nous souhaitions vérifier l'homogénéité d'expression des clones. Pour cela, les clones correspondant aux promoteurs *rrnC*, *rpsJ* et *yfhL*, possédant respectivement une forte activité, une activité modérée et une faible activité au terme de 18h d'incubation dans le milieu Mops, ont été observés au microscope à épifluorescence (Cf Annexe III). La Figure 52 présente les histogrammes indiquant la variabilité de taille des cellules de chaque population ainsi que la variabilité de l'intensité de fluorescence cellulaire (*gfp_Mut2*). Par construction, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration intracellulaire en GFP et donc à l'activité de chaque promoteur.

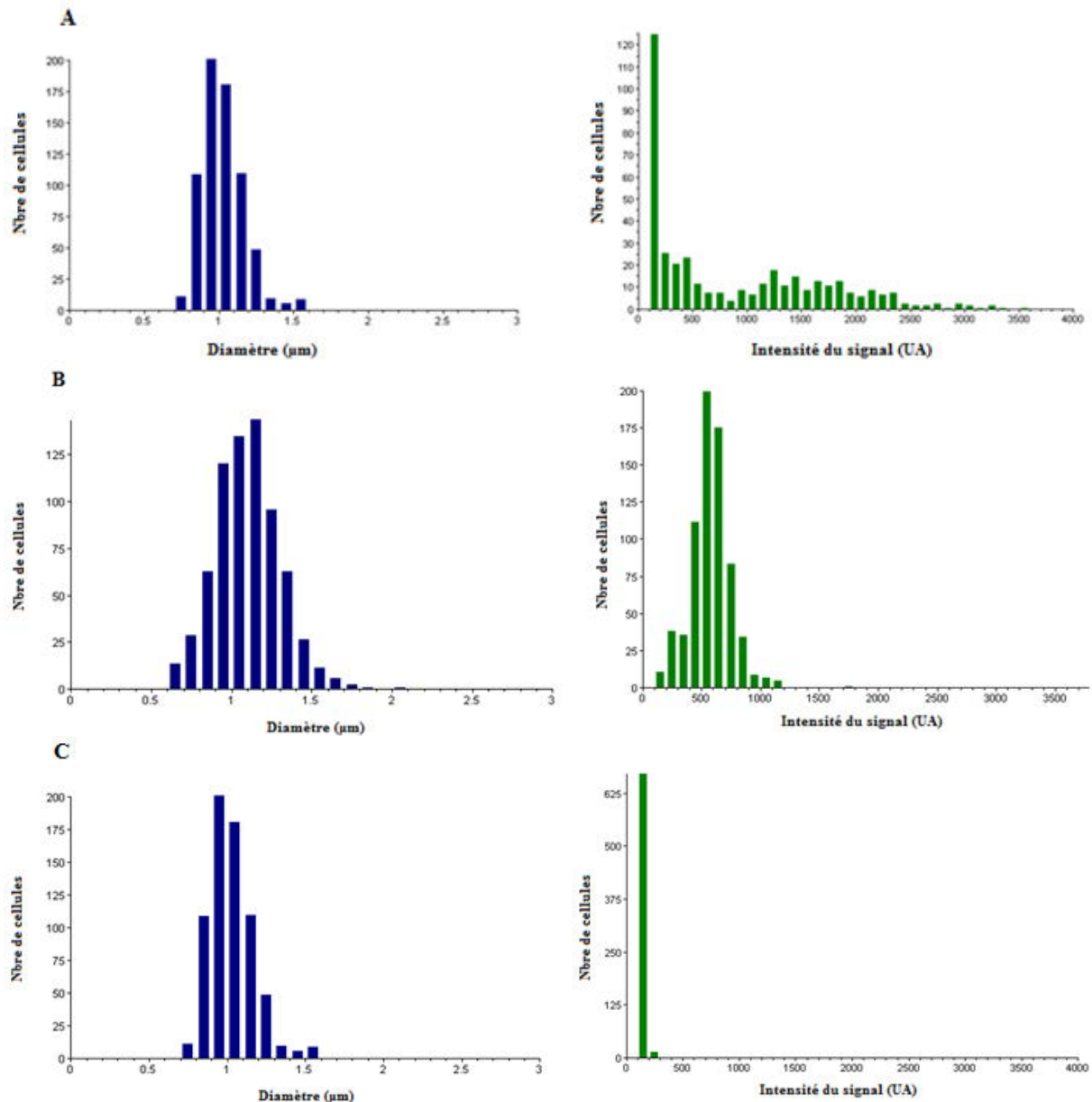


Figure 52 : Variabilité de la forme cellulaire et de l'intensité de fluorescence cellulaire chez trois populations de clones *E. coli* K12 MG1655 correspondant aux promoteurs *rrnC* (A), *rpsJ* (B) et *yfhL* (C). Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (grossissement x400). Les paramètres de formes et l'intensité de fluorescence de chaque cellule sont analysés automatiquement par un logiciel dédié NIS-Br (Nikon).

Si la variabilité de la taille des cellules est similaire d'une population à l'autre, la variabilité de l'intensité de fluorescence est tout autre. Tandis que la population de clones correspondant au promoteur *yfhL* est parfaitement homogène (taille et signaux de fluorescence faibles), celle du promoteur *rpsJ* l'est un peu moins mais reste globalement représentative d'une mesure à l'échelle cellulaire. En revanche, l'analyse de la population de clones correspondant au promoteur *rrnC*, nous indique un second biais dans l'expérimentation pouvant conduire à la sélection de promoteurs non pertinents. En effet, l'importante intensité de fluorescence de cette population n'est due qu'à quelques cellules. La réponse étant très hétérogène, il paraît peu pertinent de considérer l'activité du promoteur comme étant significative (Cf Annexe 3). Si toutes les populations de clones ne sont pas hétérogènes, la présence de quelques-unes nous incite à la prudence quant à la validité de certains résultats primaires.

Lors d'une étude portant sur l'homéostasie du zinc chez *E.coli* K12 MG1655 à partir de la banque, il s'est avéré que le promoteur *zraP*, connu pour être très actif en présence de zinc, ne répondait pas. Sachant que le design des *primers* pour la construction de la banque a été réalisé automatiquement à l'aide du logiciel Primer3, il n'était pas impossible que des erreurs aient été commises. La séquence suivante correspond à la séquence promotrice du gène *zraP* :

>EG11918 *zraP* Zn-dependent periplasmic chaperone

```
CCCTACGCGGCTTCCCGACTCCAGAGCGGGATAAGCACATTACCTTTTTCCAGTAATGCCTGGCGGTCTGCCTCGCTTGCCC
GCCATAATCACGAATCACAGTTACCGCAAACAATCCCACCAGCCCAACAATGACCACGGGGAGGATCGCGCTTAACCATTTA
GCTAAGGAGTCTTTAGAACGTTGCATAAAAACGCATCTTCTTCTTTGCCTGCTCATCCCTTTCTGACAGCAGAAATCATGCCAT
CTTTTATCAGCGCTTACCCTGCGCTGTAACACAAAGGCTTAAGTTTTCAATGAGTAAAAATGACTCGCTACCCGCAGCAGGCGA
GTCATTTTTACTCGTTTATCATGCCAGATTACCCGTCATATCAGCGTTTCATCGTTGGCACGGAAGATGCAATACCCGAAGTA
AGACAACCCTGGAGGATTAACC
```

La séquence en **bleue** représente la séquence clonée à l'aide des primers *forward* et *reverse* désignés par le logiciel pour le gène *zraP*. Juste en amont du gène, 47 nucléotides (séquence en **pourpre**) ont été omis. En les intégrant dans la séquence clonée, l'activité du promoteur a été rétablie. Il n'est pas impossible que d'autres erreurs du même genre aient été commises pour d'autres promoteurs.

Un dernier biais réside dans l'utilisation de microplaques 96 puits à fond noir. Elles ont été préférées aux microplaques 96 puits transparentes afin de s'assurer de la qualité de la mesure de la fluorescence. Cependant il était impossible de vérifier l'homogénéité de la croissance cellulaire au travers des différentes modalités. Il est donc possible que certains promoteurs apparaissant comme intéressants soient en fait des artefacts.

6. Conclusion

Les résultats obtenus avec *E.coli* vont dans le sens de l'identification d'un pattern de gènes définissant une réponse adaptative à un environnement de type sol. Toutefois, au regard des biais mis en évidence, il est nécessaire de confirmer l'activité des promoteurs sélectionnés. Sous couvert de cette confirmation, l'hypothèse selon laquelle il existerait un pattern de gènes ancestraux pivots de la réponse adaptative semble erronée puisqu'aucun gène hautement conservé chez *P.aeruginosa* PAO1 n'a été mis en évidence. La recherche de gènes (chez une bactérie modèle du sol) caractéristiques d'une réponse adaptative à un type d'environnement (minéral) devra donc s'effectuer au travers de la mise au point de protocoles basés sur les technologies omiques ou faire l'objet d'un effort expérimental au travers du développement d'une banque de biosenseurs bactériens fluorescents propre au modèle d'intérêt.

Bibliographie

- Balland, C. 2010. Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions: Modélisation et Rôle des Paramètres Environnementaux. Thèse doctorale de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1).
- Grybos, M., Billard, P., Desobry-Banon, S., Michot, L. J., Lenain, J. F., & Mustin, C. 2011. Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. *Journal of colloid and interface science*, 362(2), 317-324.
- Oulkadi, D., (2013). Gels de silice hybrides dopés en particules colloïdales de smectites pour l'étude des interactions bactérie/silicate. Thèse de doctorat de l'Université Lorraine (Nancy 1). 180p
- Oulkadi, D., Balland-Bolou-Bi, C., Billard, P., Kitzinger, G., Parrello, D., Mustin, C., & Banon, S. 2014. Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels. *FEMS microbiology letters*, 354(1), 37-45.
- Trevino, V., Falciani, F., & Barrera-Saldaña, H. A. (2007). DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Molecular Medicine*, 13(9-10), 527.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
- Ying, L., & Sarwal, M. (2009). In praise of arrays. *Pediatric Nephrology*, 24(9), 1643-1659.
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G. & Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for Escherichia coli. *Nature methods*, 3(8), 623-628.

Synthèse et Discussion - Des approches systémiques multiparamétriques à la biologie synthétique

Actuellement, pour développer des nouveaux biosenseurs et renforcer nos connaissances des réseaux de régulation génétique qui gèrent la réponse des bactéries aux variations de leur environnement, l'approche réductionniste basée sur une utilisation massive et indépendante des techniques « omiques » est souvent privilégiée. La stratégie étant de rechercher dans le protéome et le transcriptome bactérien les réponses métaboliques les plus spécifiques possibles. Cette démarche, mais aussi des contraintes techniques ne permettant pas d'explorer une multitude de conditions expérimentales, conduit souvent à produire des schémas d'expérience déterministes (*e.g.* variation de la concentration d'un seul et unique métal dans un milieu simple/minimal non-fluorescent). L'environnement est si contraignant que la cellule ne peut répondre que d'une seule manière. Dès lors que le milieu se complexifie, la réponse cellulaire observée perd de sa spécificité car le contexte d'expression n'est plus maîtrisé (*cf.* Introduction).

Comme il a été montré dans les chapitres précédents, ce travail de thèse privilégie et explore une seconde voie, plus systémique et proche des démarches utilisées pour l'identification des systèmes en automatique. Elle considère le couple biosenseur-milieu comme un système identifiable dont les réponses multivariées peuvent être étudiées et modélisées en lui imposant des conditions physico-chimiques initiales parfaitement déterminées, mais variées. La diversité des réponses spectrales générées par des combinaisons de biosenseurs bactériens fluorescents en milieu complexe est ici un avantage et plus une contrainte. Ce travail est aussi un premier pas prometteur vers une approche multiparamétrique du monitoring environnemental. Il démontre et illustre les possibilités offertes par le couplage entre biosenseurs multicolores et algorithmes de traitements du signal. L'idée *in fine* étant d'obtenir par une combinaison de promoteurs *ad hoc*, un spectre de réponse assez vaste et diversifié permettant d'identifier une large gamme de stimuli environnementaux.

1. Les approches multilinéaires avec des biosenseurs fluorescents

Dans cette approche, le problème de modélisation et d'estimation de la réponse des biosenseurs à cellule entière est considéré comme un problème de séparation de sources, fondé sur l'analyse spectrométrique des signaux de fluorescence émis par des suspensions de cellules en contact avec des éléments en solution ou présents dans des minéraux.

1.1. Forces de la méthode

La procédure d'identification exploite la diversité des réponses populationnelles des biosenseurs bactériens dans des conditions expérimentales variées afin d'extraire par des méthodes de séparation de sources, les réponses des systèmes rapporteurs et par conséquent l'expression de gènes dans des milieux de composition chimique variables. Ces réponses sont estimées et interprétées, avec un minimum *a priori*, à partir des signaux spectraux mesurés grâce à des algorithmes de décomposition multi-linéaires sous faibles contraintes. La qualité des

spectres ne variant pas au cours du temps ou selon de l'état des variables étudiées, l'approximation linéaire est justifiée.

Les résultats obtenus dans ce travail démontrent très clairement l'intérêt de cette approche pour :

- l'obtention de modèles multi-paramétriques estimant l'activité simultanée de promoteurs dans des conditions environnementales variées, quelles que soient les constructions génétiques employées, le recouvrement spectral des rapporteurs fluorescents employés ou la présence de signaux parasites (autofluorescence du milieu).
- l'intégration d'une dimension temporelle cumulative dans la réponse selon une approche non-destructive.
- la séparation conjointe et la modélisation des signaux parasites extérieurs inattendus (excrétion de substances fluorescentes), corrélables ou non à l'activité des promoteurs.
- l'identification des mécanismes d'altération et des processus de transformations bioinduits de minéraux chromagènes via le traitement des signaux d'absorbance UV-Vis des particules dispersées dans un conducteur optique (gel de silice).

A côté des nombreux avantages d'une telle approche, il est possible de distinguer quatre principales limites quant à son utilisation.

1.2. Les limites technologiques et instrumentales

Malgré les avancées remarquables réalisées au niveau de la sensibilité des appareils de mesure de signaux de fluorescence, il est nécessaire d'avoir une concentration cellulaire suffisante de protéines fluorescentes pour obtenir un signal exploitable, *i.e.* dont les variations d'intensité selon les modes soient détectables. Cette limite a notamment été appréciée lors d'observations au microscope de la souche PAO1 *bfrB::gfp* en présence de nontronites NAu-2 dont la fluorescence était observable en microscopie mais non détecté par une analyse spectrométrique. Cela pose une contrainte quant au choix des promoteurs à étudier qui doivent être particulièrement actifs si l'on souhaite obtenir une réponse analysable dans des délais respectables (ne dépassant pas 24h). Cette contrainte est d'autant plus présente si l'on utilise plusieurs systèmes rapporteurs simultanément car les signaux se trouvent alors dilués. La contrainte imposée sur le choix des promoteurs peut être modulée par le choix du support du système rapporteur. Il est possible d'intégrer le système « promoteur::rapporteur » à la bactérie d'intérêt de deux manières.

La première consiste à intégrer le système directement au sein du génome chromosomique de la bactérie par l'intermédiaire de transposons, la seconde à le cloner au sein d'un plasmide qui sera par la suite inséré dans la bactérie par transformation. L'intégration chromosomique donnera une réponse au plus proche du niveau d'activité réelle du promoteur étudié puisque le système rapporteur est présent sous la forme d'un seul exemplaire. Cependant, le promoteur doit avoir une activité assez forte pour que le signal rapporteur puisse atteindre une intensité appréciable rapidement. L'avantage des fusions de gènes plasmidiques est que le signal émis par le système rapporteur est amplifié proportionnellement à l'abondance du plasmide dans la cellule, *i.e.* de l'ordre d'une dizaine de copies pour un plasmide dit « low-copy », plusieurs centaines de copies pour un plasmide dit « high-copy ». En s'intéressant uniquement à l'aspect qualitatif, il est possible d'étudier des ensembles de promoteurs possédant d'importants écarts d'activités en ajustant a priori le type de support des systèmes rapporteurs. Cependant, l'analyse quantitative de tels systèmes rapporteurs multicopies peut être très fortement biaisée si l'on ne prend pas soin d'exprimer conjointement la protéine régulant l'expression du promoteur étudié. Les récents développements en biologie synthétique apportent une alternative particulièrement intéressante à ce problème: il est désormais possible, à l'aide d'algorithmes bioinformatiques performants, d'ajuster sur une large gamme dynamique (jusqu'à un facteur 100 000), le niveau d'expression d'un gène en modifiant sa séquence RBS (site de fixation du ribosome ou séquence Shine et Dalgarno) (Salis *et al.*, 2009)

Il est aussi envisageable de jongler avec les rendements quantiques de différentes protéines fluorescentes afin d'augmenter le PM lors de la mesure et donc amplifier les signaux des faibles expressions sans saturer les signaux des fortes expressions. Cependant, il y a un risque incompressible de perte de résolution de l'information spectrale.

La limite de sensibilité des appareils soulève indirectement une autre contrainte. Comme suggéré un peu plus haut, en raison du caractère cumulatif de l'information fournie par les biosenseurs à cellule entière fluorescents, si le temps d'attente pour l'obtention d'un signal analysable est trop important par rapport aux autres signaux, il y a un risque de biais du point de vue de la cohérence de l'information d'intérêt lié à la stabilité respective des signaux. Les protéines fluorescentes présentent des stabilités différentes au sein d'une cellule bactérienne. Si la mesure est trop tardive, il faut envisager la possibilité que l'intensité de certains signaux ne soit plus corrélée avec la réponse initiale de la cellule mais en partie corrélée à une expression secondaire non spécifique.

Les différentes contraintes présentées jusqu'ici sont centrées sur le problème de l'étude simultanée d'un promoteur fort vs un promoteur faible. Mais il est nécessaire de discuter d'une seconde limite : la cohérence des protéines fluorescentes disponibles du point de vue de leurs propriétés physiques communes. Outre les différences de rendement quantiques qui peuvent induire des biais résolutifs, les différences de temps de maturation du chromophore des protéines fluorescentes peuvent induire une incohérence temporelle des signaux au sein d'un même spectre. En effet, le temps de maturation des protéines fluorescentes peut varier de quelques minutes (*e.g.* GFP *mut2*) à plusieurs heures (*e.g.* mOrange2). Ainsi, mesurer au moment adéquat, l'intensité d'un signal issu d'une protéine à temps de maturation long sera corrélée à la réponse initiale de la cellule à son environnement tandis que l'intensité des signaux issus de protéines à temps de maturation significativement plus court pourrait être, au même moment, corrélé en partie à d'autres événements, *i.e.* les signaux ne seraient plus représentatifs d'un même historique. En revanche, comme présenté dans la sous-partie « Perspectives », ce décalage temporel de l'information au sein d'un même spectre peut être avantageux pour certaines études. Enfin, il est important de souligner une dernière contrainte intrinsèque à la maturation des protéines, *i.e.* la nécessité de cofacteurs. Dans le cas des protéines fluorescentes, la limite majeure reste le besoin absolu de dioxygène pour une conformation active. Certaines études ont permis de développer des protéines fluorescentes utilisables en condition anaérobie mais leurs caractéristiques restent pour le moment peu attractives (Mukherjee *et al.*, 2013). Par conséquent, les applications dans le domaine des biosenseurs restent essentiellement cantonnées aux phases aérobies.

1.3. Les limites biologiques

Au sein d'une cellule vivante, la synthèse de toutes molécules requiert de l'énergie. Partant de ce constat, il n'est pas difficile d'extrapoler le fait que la production de protéines exogènes sans aucune utilité métabolique perturbe la dynamique énergétique de la cellule. Si pour la production d'un seul type de protéine fluorescente la flexibilité métabolique de la cellule lui permet de gérer le déséquilibre engendré (pas de variation significative des propriétés de croissance), il lui sera de plus en plus difficile de maintenir un métabolisme avec un nombre croissant de protéines « rapporteur ». Il paraît ainsi difficile d'envisager l'étude de l'activité de plus de quatre promoteurs au sein d'une seule et même cellule. Au-delà, il y a un risque d'enregistrer des signaux corrélés avec un métabolisme d'alerte plutôt qu'avec un métabolisme représentatif d'une réponse adaptative. Le problème pourrait aussi bien être placé du point de vue de l'encombrement spatial que provoquerait la présence de plusieurs centaines de protéines exogènes. Sachant aujourd'hui que l'intérieur d'une cellule ne peut en aucun cas être assimilable à une piscine où « flottent » ses divers constituants (Zhou, H. X. 2013), la dynamique cellulaire sera sans aucun doute perturbée. Ces contraintes incompressibles interdisent tout screening haut-débit propre aux technologies « omiques ». Cependant, l'intérêt de la méthode se situe en aval de ces analyses. Elle permet une étude continue, facilitée et plus poussée d'ensembles restreints (et réfléchis) de promoteurs à l'échelle de cellule unique ou d'une population.

Une autre limite induite par le fonctionnement d'une cellule vivante trouve son essence dans ce qui est communément appelé le biais d'usage du codon, *i.e.* les constructions génétiques développées pour une espèce particulière ne seront pas exprimées de façon équivalentes dans une autre espèce. En effet, puisque la fréquence d'utilisation des codons génétiques varie d'une espèce à l'autre, la vitesse de traduction du brin d'ARN messager variera en proportion. Plus un codon est utilisé, plus vite sera réquisitionné l'ARN de transfert correspondant et inversement. Ainsi, la vitesse d'élongation de la chaîne protéique sera localement différente d'une espèce à l'autre, avec comme conséquence des variations de vitesse d'apparition et/ou de l'intensité du signal fluorescent. Dans le même ordre d'idée, une séquence promoteur ne sera pas reconnue de façon aussi efficace dans toutes les bactéries. Ainsi, passer d'une espèce à une autre nécessite à chaque fois un travail fastidieux d'adaptation : adaptation du biais de codon pour conserver les caractéristiques des protéines rapporteurs, recherche de nouveaux ensembles de promoteurs appropriés à l'espèce.

1.4. Les contraintes systémiques

La troisième limite quant à l'utilisation de la méthode est une limite propre à l'analyse des données issues de l'étude de systèmes complexes. Comme le montre les expériences réalisées sur un système bactérie-fer assez simple, la réponse fluorescente des biosenseurs bactériens peut être compliquée et difficile à interpréter sans a priori ou expériences complémentaires : observation d'un signal lié à la production de la pyoverdine sans possibilité de l'identifier. La non-séparabilité des signaux sous certaines conditions peut être aussi perçue comme une faiblesse si l'on se place du point de vue d'un traicteur de signal, mais du point de vue d'un biologiste, la non-séparabilité des sources ne signifie pas l'échec de la méthode. Elle fournit une information clé sur leur comportement, *i.e.* leur dépendance sur un ou plusieurs modes. La difficulté étant d'identifier si la non-séparabilité est réelle ou liée à un nombre insuffisant de sources.

Ceci nous amène à la quatrième limite de la méthode qui est intrinsèquement liée aux méthodes de traitement de signal du type Candecom/Parafac, *i.e.* le choix du nombre de sources.

1.5. Les contraintes algébriques et mathématiques

Il n'existe à ce jour aucune méthode permettant de déterminer avec certitude le nombre de sources nécessaires à une analyse optimale. Les méthodes actuelles, tout comme celle développée dans ce travail, permettent seulement d'estimer a posteriori, et avec plus ou moins d'efficacité, la pertinence du choix effectué. Un biais est donc clairement introduit quant à la validité physique des modèles proposés. Cependant, cette limite est à nuancer car la démarche analytique n'est pas totalement « sans a priori ». La décomposition CP est par essence sans a priori au sens où il n'y a besoin d'introduire le spectre des différentes sources à extraire. En revanche, un a priori aidant au choix du nombre de sources existe implicitement puisque l'on connaît le nombre de rapporteurs introduit dans le système. D'une manière générale, la limite inférieure quant au nombre de sources à extraire sera : le nombre de rapporteurs + un bruit de fond quelconque. De plus, le choix des promoteurs ne s'effectuant pas au hasard, cela implique une connaissance *a priori* de leurs comportements sous certaines conditions. Ainsi, des comportements biologiquement aberrants (bien que mathématiquement juste) pourront être détectés. Ces connaissances a priori serviront de guide (de bornes) pour apprécier la validité des différents modèles proposés pour un même jeu de données.

Tableau 20 : Résumé des avantages et inconvénients du couplage PF/SFS/CP (protéines fluorescentes, spectrométrie synchrone, décomposition polyadique canonique)

	Avantages	Inconvénients
Instrument Spectrométrie synchrone	Balayage rapide / Résolution Large domaine spectral (bandes) Brillances moyennées	Temps de réponse > 1h Dilution des signaux multiplexés
Expérimentation Plan d'expérience	Analyse non-destructive Reproductibilité et variabilité maîtrisées par la robotique	Obtention d'une diversité suffisante
Biophysique/Biosenseurs Protéines fluorescentes	Séquences codantes connues Nombreux variants (multicolores) Ajustement des biais de codons/ RBS	Maturation aérobie des protéines fluorescentes Nombre de rapporteurs /cellule Expression cellulaire stochastique
Algorithmes Séparation de sources	Convergence rapide et unicité sous faibles contraintes Détection des colinéarités Fusion de données ou traitements par blocs	Choix du nombre de sources Inconnues Modèles uniquement linéaires

Une dernière limite n'a cependant pas été présentée. Les modèles multilinéaires, comme leur nom l'indique, dressent les relations linéaires entre plusieurs variables. Qu'en est-il des relations non-linéaires ? Peut-on les détecter avec la méthode proposée ici ? Une partie de la réponse se situe dans l'exploration des données au travers du choix du nombre de sources à extraire. La question est traitée en détails dans la dernière partie de la discussion qui propose une ouverture générale sur l'étude de systèmes complexes dans leur globalité.

2. Perspectives

L'objectif méthodologique de la thèse était de développer une technique d'analyse de signaux de fluorescence multiplexés émis par des biosenseurs bactériens et représentant l'expression d'un ensemble de gènes. Cet objectif a été clairement atteint et les résultats dépassent les attentes initiales. La spectroscopie synchrone fournit l'ensemble de la diversité spectrale d'un échantillon sous la forme d'un unique spectre de qualité nettement supérieure à ceux fournis par la spectroscopie à fluorescence classique. L'utilisation de la décomposition CP résout la principale limite d'utilisation des biosenseurs fluorescents (le chevauchement des signaux) et implique une démarche systémique essentielle à la compréhension de systèmes complexes (modélisation multilinéaire). Enfin, l'applicabilité de la méthode à tout type de spectre offre des perspectives remarquables.

2.1. Les modèles à n dimensions ($n > 3$)

Dans ce travail, seuls ont été étudiés des ensembles de données trilineaires : dimensionnalité minimum requise pour la possibilité d'unicité des décompositions CP. On l'a vu, ces ensembles de données permettent l'analyse d'un système selon deux paramètres croisés. Il serait fort intéressant d'augmenter la dimensionnalité des données afin d'étendre le pouvoir d'analyse de la méthode. Outre le fait d'augmenter la complexité de l'environnement pour se rapprocher d'avantage des conditions réelles, l'utilisation de données de dimensionnalité supérieure à 3 apporte un avantage mathématique non-négligeable, *i.e.* la possibilité d'unicité partielle. En effet, lors de colinéarité totale de plusieurs sources sur un mode, la propriété d'unicité des décompositions trilineaires est perdue car une partie des signaux de fluorescences seront attribués de manière aléatoire aux spectres des différentes sources et donc une partie de leur

comportement sera incertain (séparabilité partielle des spectres, cf. Article *Multi-way signal processing for multicolor fluorescent biosensing*). Cependant, comme l'a démontré Fabrice Caland dans sa thèse, dans un cas où il est impossible de résoudre de manière unique un problème trinéaire, le simple ajout d'une diversité peut assouplir les conditions d'unicité et assurer l'unicité sur certains modes. Ainsi, dès l'emploi de données quadrinéaires, le comportement des différentes sources pourrait être assuré selon certains paramètres malgré la présence de colinéarités. Cependant, l'attrait que suscite l'utilisation de données à haute dimensionnalité est à nuancer : la complexité des plans d'expérience nécessaire à leur production croît extrêmement vite. Si une microplaque est suffisante pour la production de données trinéaires variées, il en faut bien plus pour la production de données quadrinéaires. En effet, pour x points du troisième paramètre, il est nécessaire d'utiliser $(x-1)$ microplaques supplémentaires. Et pour tous paramètres supplémentaires, chaque microplaque doit être démultipliée d'autant de points définissant le paramètre additionnel. Seul l'ajout d'une dimension temporelle ne nécessite pas l'apport de microplaques. Cependant, il faut s'attendre à ce que la prise en compte du temps fasse apparaître plus de colinéarité entre les sources qu'elle n'apporterait de diversité (cf. « Estimation conjointe des réponses temporelles et au cadmium des biosenseurs », Thèse F. Caland, 2013).

2.2. Les approches « environnementales » non destructives et non invasives

En termes d'application, la méthode laisse entrevoir des possibilités passionnantes. Dans ce travail, la méthode a été appliquée à l'étude de promoteurs à l'échelle d'une population cellulaire. Cependant, en couplant la microscopie à fluorescence avec un balayage synchrone, il est tout-à-fait envisageable d'appliquer la méthode à l'échelle de la cellule unique (« single-cell. approach »). Cette perspective ouvre directement un autre domaine d'application des protéines fluorescentes, *i.e.* le marquage de protéines. L'emploi de protéines de fusion permettrait d'étudier les niveaux de corrélation entre les niveaux d'activité d'un ensemble de promoteurs, la quantité de protéines correspondantes (ou d'autres protéines d'intérêts) produites et leurs répartitions spatiales en fonction de divers contextes environnementaux. De plus, la mise au point aujourd'hui de protéines fluorescentes « time-lapse » ou photo-activables permet d'envisager l'étude de la dynamique temporelle de ces relations complexes (Subach, F. V. et al. 2009).

De même, de trop grandes différences dans les temps de maturation des protéines fluorescentes engendreront des incohérences temporelles au sein d'un même spectre. Cependant, il peut être intéressant de jongler avec différents ensemble de protéines fluorescentes pour un même ensemble de promoteurs afin d'étudier la possibilité de relations d'interdépendances à différentes échelles de temps.

Ces champs d'application tendent vers la mise au point de protocoles peu-invasifs et non-destructeurs autorisant une étude quasi-complète de la dynamique cellulaire à petite échelle, *i.e.* intégrant un faible nombre de variables. Les comportements non-linéaires d'une cellule vivante, probablement dues à la non prise en compte de processus se déroulant sur plusieurs échelles spatio-temporelles, pourraient être en partie décrits.

Enfin, il a été montré dans ce travail que la méthode CP était applicable à n'importe quel type de spectre. Ceci ouvre des perspectives dans le domaine des sciences environnementales bien au delà des seules applications en Science du Vivant.

3. Une ébauche de biosensing environnemental

L'idée générale autour de laquelle s'est construit ce travail de thèse était de définir un réseau naturel de promoteurs représentatifs de la réponse cellulaire à un type d'environnement afin d'élaborer un circuit synthétique linéaire intégrant chacun de ces promoteurs couplés à un gène rapporteur. Les modèles multi-linéaires fourniraient ensuite une interprétation systémique de la réponse conjointe d'un ensemble de biosenseurs aux fluctuations physico-chimiques à petite et grande échelle de leur environnement.

L'avantage principal d'une telle approche est que la complexité se retrouve au cœur du principe d'analyse. Elle n'est plus considérée comme une source de bruit mais comme un élément résolutif. La démonstration la plus probante de ce principe étant l'expérience d'altération des nontronites N_{Au-1}/N_{Au-2} par *P. aeruginosa* PAO1 au sein de laquelle la production de métabolites, l'expression d'un gène et l'évolution de la structure des nontronites ont pu être conjointement modélisés. Cette expérience ouvre sur l'une des perspectives les plus intéressantes de la méthode, *i.e.* son indépendance au type de données spectrales utilisées. Il a été présenté l'intérêt du couplage spectre UV-vis / Fluorescence mais il est tout-à-fait envisageable d'utiliser conjointement d'autres types de spectroscopies pour accéder à une compréhension plus fine de l'évolution de la structure d'un matériau ou d'un milieu en fonction d'activités biologiques. On peut penser à la spectroscopie Raman qui permet de caractériser la composition moléculaire et la structure externe d'un matériau, et/ou à la spectroscopie infrarouge, deux analyses complémentaires. Il n'est pas non plus interdit de combiner la méthode avec la qualité exceptionnelle du rayonnement synchrotron. Ainsi, il devient clairement envisageable d'étudier finement, et de manière non destructive, les dialogues entre matières « inertes » et matières « vivantes ».

Ainsi, au travers du spectre des connaissances systémiques caractérisant le fonctionnement d'un écosystème, l'un des enjeux majeur de la méthode se situe dans la possibilité de développer des techniques de biomonitoring / biosurveillance spécifiques (spécifique au type de pollution - simple ou combinée- localisée dans tel type d'environnement) en jouant sur les bifurcations (changement d'équilibre) du système considéré. La méthode peut être, sans grande exagération, portée sur le moyen terme. Les protocoles expérimentaux et les techniques d'analyses étant bien plus facilement mis en œuvre dans des environnements aqueux, je pense que l'on peut envisager assez rapidement la mise au point de procédures spécifiques pour la caractérisation d'eau en provenance de nappes phréatiques souillées ou le traitement d'eaux usées par exemple. En revanche, l'application à l'analyse d'un sol nécessite la levée de certains verrous techniques dont les plus importants sont probablement l'observation des biosenseurs bactériens à la surface ou au sein d'un sol d'intérêt immobilisé (importance de la structure physique et chimique d'un sol dans sa réactivité) et l'application localisée des techniques spectrales notamment dans l'interprétation des résultats (composition très hétérogène).

Cependant, certaines perspectives passionnantes peuvent être envisagées *in vitro*. Outre le fait d'étudier les interactions microorganismes/minéraux dans les sols, il apparaît concevable d'étudier les relations de symbioses entre les microorganismes et les plantes, les arbres, etc. Aussi bien la symbiose qui relève de la mise à disposition mutuelle d'éléments particuliers (au niveau de la rhizosphère par exemple) que la symbiose totale où le microorganisme vit au sein même du tissu végétal. Sur la même idée, la méthode peut ouvrir une nouvelle voie d'étude des infections (bactérienne ou fongique) propre au monde végétal.

La compréhension des systèmes environnementaux s'effectuera de proche en proche en corrélant petit à petit la réactivité des biosenseurs à l'évolution des spectres de structures. L'une des clés de voute de la méthode est donc le choix des promoteurs à tagger. Par rapport à tout microorganisme d'intérêt, un travail de recherche important est à faire. Deux ensembles de promoteurs doivent être sélectionnés pour une interprétation optimale des réponses. Le premier concerne l'état physiologique de la bactérie. Il est nécessaire d'utiliser un ensemble d'invariants caractérisant la stabilité de la dynamique cellulaire. Leur constance définira en effet le cadre permettant d'interpréter les réponses du second ensemble. Ce second ensemble concerne la réponse adaptative de la cellule. Il correspondra à un ensemble de gènes dits « carrefours », c'est-à-dire de gènes pivots permettant à la cellule de passer d'un métabolisme à un autre. L'intérêt premier de ces gènes réside dans leur importante modularité. En effet, la capacité de la méthode repose en partie sur le fait de coder un maximum d'information sur un ensemble restreint de promoteurs. Il existe différents niveaux de spécificité chez ce type de gènes. Un gène pivot peut être à la base de différentes voies métaboliques ayant trait à la même fonction, ou être plus fondamental. Un travail sera donc à effectuer quant au degré de spécificité

à utiliser conjointement lors d'une analyse pour conserver un maximum d'information, *i.e.* trouver l'équilibre entre peu spécifique (lié à différentes fonctions) et trop spécifiques (lié à une unique voie). Mais de manière optimale, je pense qu'il sera nécessaire de construire plusieurs ensembles de biosenseurs que l'on utilisera de manière consécutive pour caractériser au mieux un environnement. Le travail en amont de la première application concrète est considérable. Et on l'a vu, il n'apparaît pas évident au premier abord d'identifier des gènes d'intérêts. L'application à court terme de la méthode est malheureusement inenvisageable.

4. Vers l'étude des systèmes complexes vus comme un tout

L'approche réductionniste en biologie a permis de comprendre la relation structure/fonction des différents constituants d'un organisme vivant allant des composants moléculaires de la cellule, tels que l'ADN ou les protéines, à des structures organisées et spécialisées comme les organites (e.g. rôle énergétique des mitochondries) et les tissus cellulaires formant les organes chez les organismes supérieurs. Or, malgré toutes les connaissances accumulées, cette démarche réductionniste se trouve toujours dans l'incapacité d'expliquer les comportements émergents et divergents (non-linéaire) du Vivant, c'est à dire résultant des interactions multiples et complexes entre ces constituants et non de la simple addition des capacités et propriétés de chacun d'entre-eux. Les molécules isomères sont des exemples très intéressants du concept d'émergence. Elles permettent de mettre en lumière non pas l'importance des parties sur les propriétés d'un système, mais l'importance de leur schéma d'interaction. L'approche réductionniste détruit ces schémas en étudiant les parties de manière indépendante. Explorer la structure d'un système revient à créer autant de systèmes qu'il y a de parties. Idéalement, un système doit être étudié dans sa globalité pour y déceler les structures qui sous-tendent les propriétés de niveau supérieur.

La Vie est une propriété émergente de l'organisation de la matière organique. Ainsi, ce n'est pas en étudiant individuellement les lipides, les carbohydrates, les protéines, l'ADN ou les ARNs que nous allons comprendre les propriétés d'un système vivant mais bien en étudiant leur coordination. La solution serait de posséder une technique d'analyse multidimensionnelle, c'est-à-dire une technique capable d'intégrer simultanément l'ensemble des variables du système étudié, l'ensemble de ses parties, et d'en extraire leurs structures. Nous l'avons vu, le développement de telles méthodes s'est réalisé au travers du développement des modèles d'analyses multilinéaires. Contrairement aux modèles classiques, ces modèles sont capables de dresser les structures linéaires reliant entre elles plus de deux variables et permettent ainsi de révéler des structures du système jusqu'alors insoupçonnées. Mais intrinsèquement, ils ne peuvent rendre compte des comportements non-linéaires. En se référant à la matrice expérimentale permettant la production de données trilineaires, de tels comportements s'apparenteraient par exemple au comportement d'une source le long d'une ligne qui différerait légèrement des autres lignes. Pour cette source, la décomposition CP modélisera le comportement majoritaire, décrivant au mieux les données. Ainsi, le comportement légèrement différent ne sera pas intégré à la modélisation et représentera une partie du pourcentage de données non-expliquées. Une astuce permet cependant de révéler ce type de comportement. En augmentant le nombre de sources, la décomposition CP subdivisera les sources pour lesquelles certains comportements n'étaient pas pris en compte. Pour les petits jeux de données comme ceux utilisés au cours de ce travail, il est relativement aisé de constater si la duplication d'une source est significative ou non, *i.e.* si cela correspond à un comportement réel ou à une variation du bruit de fond. Mais il n'en sera pas de même pour des bases de données 100 ou 1000 fois plus grande (la valeur de la composante en énergie de la source peut être un indice mais si le comportement est très local, la valeur n'en sera pas moins faible). De plus, même s'il paraît intéressant de pouvoir extraire les comportements non-linéaires, la modélisation résultante est alors partiellement discrète (une même source considérée comme plusieurs). La qualité du model en sera impacté du point de vue de sa cohérence mais aussi par le fait que la subdivision

d'une source engendre une colinéarité qui engendrera alors une indétermination sur les comportements.

Le problème de la modélisation des phénomènes non-linéaires est un problème fondamental toujours délicat à l'heure actuelle. Le principal obstacle provient certainement de la difficulté de prendre en compte l'ensemble des variables d'un système. D'un côté, plus l'on souhaite être précis dans la description d'un système complexe, plus les temps de calcul seront long, pour ne pas dire, excessivement long. Ainsi, dans la plupart des cas, il est difficile de disposer de tous les éléments nécessaires à la compréhension de certains comportements. De l'autre, les outils mathématiques dont on dispose sont difficilement applicables aux systèmes naturels sans un minimum d'approximations. Cette nécessité provient des contraintes engendrées par l'utilisation d'outils linéaires pour la description de systèmes qui ne le sont pas et/ou de l'extrême difficulté d'analyse des équations (linéaire ou non-linéaire) décrivant la dynamique de systèmes complexes. L'équation de Schrödinger (insoluble pour les systèmes pluri-atomiques) ou le problème à N corps (en physique newtonienne ou relativiste) en sont des exemples frappants. La nature telle que nous la connaissons est la résultante de phénomènes majoritairement non-linéaires. Cela s'observe dès l'échelle atomique avec l'émergence des propriétés moléculaires. A l'image des théories physiques dont les résultats explosent à l'infini quand on sort de leur cadre d'application, je pense qu'il est nécessaire de repenser l'approche fondamentale de l'étude des systèmes complexes.

Il est étonnant de constater que pour beaucoup de domaines scientifiques qui paraissent a priori tout à fait distincts, une simple analogie suffit à les confondre d'un point de vue strictement théorique. Par exemple, certaines équipes en sociologie appliquent les techniques de modélisations multilinéaires sur des bases de données constituées de dialogues entre internautes afin de mettre à jour les différentes structures sociales qui s'établissent lorsque nous échangeons de l'information et, *in fine*, de comprendre à plus large échelle la structure de notre communication. C'est, à n'en pas douter, l'équivalence du travail effectué par tous biologistes au travers de leur volonté de comprendre ce qu'est la vie ; seul le vocabulaire change. Deux autres exemples me fascinent, dont l'un plus particulièrement. Pour le premier, il a été démontré que les modèles mathématiques servant à étudier et détecter les trous noirs pouvaient être appliqués à l'étude et la détection des tourbillons océaniques. De même qu'il existe à proximité des trous noirs une région sphérique appelée « sphère des photons » où la gravité exercée est si forte que les photons sont contraints de se déplacer sur une orbite circulaire (revenant ainsi en permanence à leur position initiale), il s'avère que les tourbillons océaniques sont circonscrits par des circuits d'eau circulaires qui, tels des barrières, empêchent les organismes vivants, mais aussi l'eau elle-même, de sortir de la zone tourbillonnaire. Cette analogie a fourni un critère de détection et de délimitation efficace (et avant cela inexistant) permettant l'étude précise de l'impact des tourbillons océanique sur la machinerie climatique, que les chercheurs savent prépondérant. Le second exemple relie l'interaction photon/solide transparent à l'interaction chaleur/liquide. Lorsqu'un dioptre air verre est éclairé perpendiculairement, 4% de la lumière est réfléchi dans l'air. Avec un dioptre double, il est naïvement attendu que 8% de la lumière soit réfléchi. Or il n'en est rien. Avec de la lumière rouge à 600nm et une épaisseur de lame valant 10^{-4} mm, environ 15 % de la lumière est réfléchi. En augmentant progressivement l'épaisseur de lame, ce pourcentage diminue pour devenir nul à $d = 2 \cdot 10^{-4}$ mm puis augmente à nouveau en suivant une sinusoïde. A côté de ça, lorsqu'une fine couche d'eau est chauffée uniformément à une certaine température, des cellules de convections apparaissent à sa surface. Et étonnamment, en augmentant progressivement la température, ces cellules apparaissent et disparaissent à un rythme constant jusqu'à une température maximum. Fondamentalement, les deux phénomènes semblent être liés. Il existe de nombreux autres exemples démontrant une certaine cohérence très fondamentale de la Nature, *e.g.* la diffusion des neutrons dans un réacteur nucléaire est décrite par la même équation que celle de la chaleur dans le manteau de la Terre. Tout ceci pour en venir au fait qu'il ne faut pas rejeter certaines similitudes, si diffuses soient-elles, entre deux domaines distincts.

En ce sens, il me semble que la théorie des nombres, et plus particulièrement celle concernant l'ensemble \mathbb{N} des entiers naturels, à beaucoup à apporter à la modélisation des systèmes complexes. Cela n'engage que moi, mais il m'est apparu que l'essence même des solutions aux principaux problèmes de la modélisation de systèmes complexes se trouve cristallisée dans ce qui fait un nombre entier. A la base, un nombre est représentatif d'une quantité d'une certaine unité. Mais pris en tant que tel, un nombre possède ses propres propriétés, *i.e.* la divisibilité par tel ou tel nombre. Lorsque l'on considère un nombre, on ne visualise pas la multitude de « 1 » qui le compose, mais seulement la résultante définie par notre système numérique. On considère sa globalité, et non ses parties. Un nombre est, selon moi, l'équivalent d'un système tel que l'on devrait les modéliser. Mais au-delà de cet aspect systémique, il me semble que la solution à l'un des plus vieux problèmes mathématiques, et certainement l'un des plus fameux, soit la clé de nouveaux outils d'analyses permettant d'appréhender la mécanique de l'émergence : prédire la position des nombre premiers dans l'ensemble des nombres entiers. Cependant, sous cette forme, le problème est formulé de manière réductrice. La question est selon moi plus fondamentale et s'étend à l'ensemble des nombres entiers. Il s'agirait de prédire la divisibilité de tout entier naturel. Dans l'univers des nombres entiers, il n'y a qu'un seul élément fondamental à partir duquel est construit l'ensemble des objets qui le constitue. C'est pourquoi je pense que l'ensemble \mathbb{N} abrite la forme la plus simple d'émergence. Le simple ajout d'une unité à un nombre entier engendre une modification drastique de ses propriétés (la propriété émergente la plus remarquable étant celle caractérisant les nombres premiers). Et à ce titre, j'ai le sentiment qu'une théorie décrivant ce principe d'émergence apportera les bases (méthodologique ou mécanistique) nécessaires à la description des lois de l'émergence de notre réalité, qui elle, repose sur plus d'une brique élémentaire. Je considère l'ensemble des nombres entiers comme une forme restreinte de notre univers de par l'équivalence de ses propriétés fondamentales et la manière dont on appréhende ses objets, *i.e.* création d'objets aux propriétés émergentes à partir d'éléments fondamentaux, objet vu comme un tout sans considération de ses parties.

Je suis conscient de l'originalité de l'approche mais comme l'a si bien dit Louis de Broglie : « Une hypothèse vaut, comme toutes les hypothèses, ce que valent les conséquences qu'on peut en déduire ». Je suis néanmoins convaincu d'une chose, la modélisation des systèmes vivants, et d'une manière générale des systèmes complexes, repose sur deux principes fondamentaux : le premier, considérer un système comme un seul et unique objet, uni, pour pouvoir modéliser ses propriétés sans approximations ou omissions, le second, s'astreindre du support physique du système (sa composition) pour modéliser sa dynamique. Je pense en effet que la dynamique d'un système peut être étudiée sous une forme plus abstraite, en considérant seulement sa dynamique énergétique, indépendamment de ses vecteurs physiques. Sans pouvoir entrer dans les détails ici, ce principe est basé sur une importante réflexion portant sur le caractère invariant des phénomènes naturels du point de vue de l'échelle et de la matière mise en jeu. En combinant ainsi ces deux approches, propriétés et dynamique énergétique, l'étude *in silico* des comportements de systèmes complexes s'apparentant (ou non) aux systèmes vivants pourra, selon moi, concrètement débiter.

L'histoire des sciences est jalonnée de nombreux retournement de situation concernant la complexité de tel ou tel problème. L'un de mes exemples favoris étant l'invention par Richard Feynman de ses diagrammes permettant de simplifier grandement le calcul des sections efficaces d'interaction entre particules. L'histoire de George Danzing lorsqu'il était étudiant en première année à Berkeley est tout aussi démonstrative. L'angle d'attaque d'un problème est crucial, et ce qui peut paraître effroyablement complexe sous une certaine approche peut paraître d'une simplicité enfantine sous une autre, si originale soit elle. Il faut pouvoir prendre du recul... et tenter !

Bibliographie

- Caland, F. (2013). Décomposition tensorielle de signaux lumineux émis par des biosenseurs bactériens pour l'identification de Systèmes Métaux-Bactéries – Thèse, Université de Lorraine).
- Mukherjee, A., Walker, J., Weyant, K. B., & Schroeder, C. M. (2013). Characterization of flavin-based fluorescent proteins: an emerging class of fluorescent reporters. *PLoS one*, 8(5), e64753.
- Salis, H.M., Mirsky, E.A., Voigt, C.A. (2009) Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nature Biotechnology* 27(10), 946-952.
- Subach, F. V., Subach, O. M., Gundorov, I. S., Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Cuervo, A. M., & Verkhusha, V. V. (2009). Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nature chemical biology*, 5(2), 118-126.
- Zhou, H. X. (2013). Influence of crowded cellular environments on protein folding, binding, and oligomerization: biological consequences and potentials of atomistic modeling. *FEBS letters*, 587(8), 1053-1061.

Annexes

I. Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels

Djihad Oulkadi, Clarisse Balland-Bolou-Bi, Patrick Billard, Geraldine Kitzinger, Damien Parrello, Christian Mustin et Sylvie Banon

Publié dans : FEMS Microbiology Letters 354 (2014) 37–45

II. Multicolor Whole-Cell Bacterial Sensing Using a Synchronous Fluorescence Spectroscopy-Based Approach.

Damien Parrello, Christian Mustin, David Brie, Sebastian Miron, Patrick Billard

Publié dans : PLoS ONE 10(3): Mars, 2015 - DOI:10.1371/journal.pone.0122848

III. Visualisation de l'expression cellulaire des promoteurs *rrnC*, *rpsJ* et *yfhL* chez *E. coli* K12 MG1655 (single cell approach)

IV. Liste et caractéristiques des 132 promoteurs « mineral responsive » sélectionnés par criblage sur microplaques.

Annexe I : Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels

CopyRights : FEMS Microbiololgy Letters 354 (2014) 37–45

Interactions of three soil bacteria species with phyllosilicate surfaces in hybrid silica gels

Djihad Oulkadi¹, Clarisse Balland-Bolou-Bi², Patrick Billard¹, Geraldine Kitzinger¹, Damien Parrello¹, Christian Mustin¹ & Sylvie Banon^{1,3}

¹Université de Lorraine, LIEC, UMR CNRS 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ²Faculté des Sciences et Technologies, Université Paris Est Créteil, UMR BIOEMCO Équipe IBIOS, Créteil, France; and ³Université de Lorraine, LIBio, ENSAIA, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Correspondence: Sylvie Banon, Université de Lorraine, LIBio, ENSAIA, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
Tel.: +33 (0) 3 8359 6073;
e-mail: sylvie.desobry@univ-lorraine.fr

Received 28 January 2014; revised 2 March 2014; accepted 10 March 2014. Final version published online 2 April 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12421

Editor: Tim Daniell

Keywords

bioweathering; nontronite; montmorillonite; colloids; hybrid material.

Introduction

In natural soils and sediments, water fills soil pores or forms film around minerals providing local anaerobic conditions until water evaporation and drainage restore aerobic conditions. Heterotrophic bacteria switch from anaerobic to aerobic metabolism and contribute to iron redox cycles of clay (Stucki, 2011). Under anaerobic conditions, production of exogenous reductant or cell-associated reducing ability caused extensive dissolution of Fe (II) from clays (Jaisi *et al.*, 2005, 2007a, b, c, 2008). Under aerobic conditions, Fe solubility in soil is insufficient to fulfill nutritional needs of trees and microorganisms. Therefore, bacteria adopt various strategies for iron uptake, that is, colonization of mineral surfaces, production of low molecular weight organic acids (LMWOA) and siderophores (Hiebert & Bennett, 1992; Barker *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 2001; Rogers & Bennett, 2004; Sandy & Butler, 2009; Hider & Kong, 2010). Proton-promoted

Abstract

To simulate iron consumption in soils, iron leaching from silicate minerals due to three heterotrophic bacterial strains and a chemical treatment was studied using hybrid silica gel (HSG) doped with two phyllosilicates, nontronite (NAu-2) or low-iron-content montmorillonite (SWy-2). HSG methodology, a novel way of separating bacteria cells from a colloidal mineral source, consisted in embedding colloidal mineral particles into an amorphous porous silica matrix using a classical sol-gel procedure. *Pantoea agglomerans PA1* and *Rahnella aquatilis RA1* were isolated from silicate-rich soils, that is, beech and wheat rhizospheres (Vosges, France); *Burkholderia sp. G5* was selected from acidic and nutrient-poor podzol soils (Vosges, France). Fe release from clay minerals and production of bacterial metabolites, that is, low molecular weight organic acids (LMWOA) and siderophores, were monitored. Two LMWOA profiles were observed with major gluconate production (> 9000 µM) for *Burkholderia sp. G5* and moderate production of lactate, acetate, propionate, formate, oxalate, citrate, and succinate (< 300 µM) for *R. aquatilis RA1* and *P. agglomerans PA1*. HSG demonstrated its usefulness in revealing clay mineral–microorganisms interactions. The effect of bacterial exsudates was clearly separated from physical contact effect.

and ligand-promoted dissolution mechanisms are the two main biogeochemical processes explaining bacteria–mineral interactions in oxic conditions (Berthelin, 1983; Banfield *et al.*, 1999). Proton-promoted dissolution is related to protonation of iron ions coordinative partners at mineral surface. Ligand-promoted dissolution is proposed to follow a three-step process (Furrer & Stumm, 1986): (1) ligand exchange for fast surface complex formation, (2) slow surface release of metal ion, and (3) ligand fast regeneration. Rate of ligand-promoted dissolution is dependent of pH, surface coverage and adsorption of organic and inorganic ligands (Dong *et al.*, 2009; Dong & Lu, 2012). Most laboratory studies on mineral bioweathering have been carried out using natural particles in suspension. Flocculation and precipitation or adhesion to bacteria cells were observed depending on mineral particle size. For colloidal clay particles like nontronite, these events occurred and participated in bioweathering (Jaisi *et al.*, 2008). To focus on how metabolite diffusion

influences mineral weathering, a new method was recently developed. It consisted of using new synthetic hybrid material with mineral colloidal particles well dispersed in a porous silica matrix. Hybrid silica gels (HSGs) were produced according to a conventional sol-gel pathway (Grybos *et al.*, 2010). HSG provided mineral particles embedded in highly hydrated silica matrix where only diffusing small molecules, that is, LMWOA and siderophores, were able to penetrate and alter clay minerals (Oulkadi *et al.*, 2014). Pore diameter of wet silica gels was less than 10 nm, whereas bacterial cells are about 1–2 μm length (Dickson & Ely, 2013). Bacteria were excluded from HSG as demonstrated for GFP-tagged derivatives of *Pseudomonas putida* KT2440 in interaction with HSG (Grybos *et al.*, 2011). HSG prevented bacteria adhesion to colloidal mineral and subsequent flocculation and precipitation. Only metabolites from microorganisms or plant root exudates were able to diffuse through HSG and dissolve minerals. Figure 1 illustrates what was expected to occur when bacteria were incubated with HSG containing colloidal mineral particles.

The aim of the present work was to use HSG doped with colloidal clay minerals for quantifying and comparing bioweathering processes due to metabolite diffusion. Nontronite (NAu-2) and montmorillonite (Wyoming, Swy-2) were chosen for their different iron pool content, which is high- and low-iron contents, respectively, to contrast the weathering conditions. On this basis, three soil bacteria species were selected for their ability to dissolve minerals in subsurface zones of accumulation of clays and iron, which is rhizosphere, or strongly leached

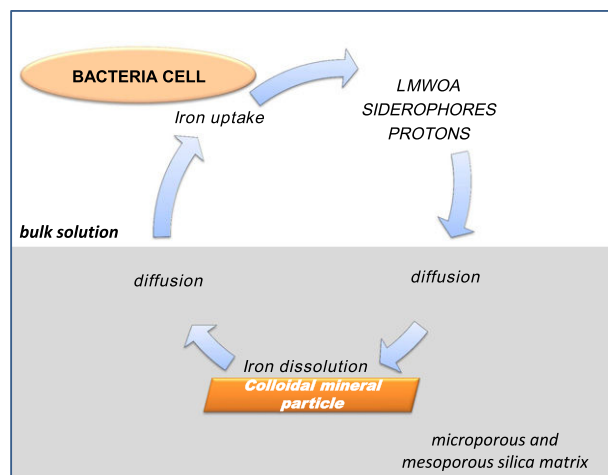


Fig. 1. Schematic representation of a bacterial cell in interaction with HSG. Bacterial metabolites and protons diffuse through HSG micropores and mesopores to mineral colloidal particles. Iron solubilization occurs, and then, Fe(III) bound to ligands (LMWOA and siderophores) diffuse back to bacteria cell.

soil that is podzol: *Pantoea agglomerans* PA1, *Rahnella aquatilis* RA1 and *Burkholderia* sp. G5.

Materials and methods

Mineral source

Nontronite (NAu-2), purchased from the Source Clays Minerals repository at Purdue University, was defined by the structural formula $[\text{Si}_{7.55}\text{Al}_{0.16}\text{Fe}_{0.29}] [\text{Al}_{0.34}\text{Fe}_{3.54}\text{Mg}_{0.05}] \text{O}_{20}(\text{OH})_4\text{Na}_{0.72}$ (Gates *et al.*, 2002). Montmorillonite (Wyoming, SWy-2) from Iko Erbslöh (Germany) was described by the structural formula $[\text{Si}_{7.74}\text{Al}_{0.26}] [\text{Al}_{3.06}\text{Mg}_{0.48}\text{Fe}^{\text{II}}_{0.03}\text{Fe}^{\text{III}}_{0.42}] \text{O}_{20}(\text{OH})_4 \text{Na}_{0.77}$ (Vantelon *et al.*, 2003). Purified Nau-2 and SWy-2 size fractions were obtained according to the procedure previously described by Michot *et al.* (2008) and briefly summarized hereafter. Clay suspensions were exchanged three times with 1 M NaCl and then washed by centrifugation and dialysis against Milli-Q water until a conductivity of $< 5 \mu\text{S}$ was reached. The suspensions were left for 24 h in Imhoff cones. After discarding the bottom of the cones, size fractionation was performed by centrifuging suspensions from 7000 to 35 000 g (Michot *et al.*, 2008). The size fraction selected from a 17 000 g gravitational field was chosen for this study. The morphological properties of NAu-2 particles were determined using transmission electron microscopy on a Philips Microscope. The average size values for the fraction we used were 705 nm in length, 138 nm in width and 1.05 nm in thickness, which proves that the layers were exfoliated in suspension (Michot *et al.*, 2008).

HSG Synthesis

HSGs were produced through an acid catalyzed sol-gel procedure using tetraethoxysilane (TEOS, Fluka; Grybos *et al.*, 2010). A clear solution of TEOS, Milli-Q H_2O , and HCl (0.1 M), defined by the molar ratio 1 : 2.45 : 0.003, was prepared by sonication (Ultrasonic cleaner, Branson 2410 DTH) at ambient temperature. Noble Agar (0.15 g L^{-1}) was added to the solution at 12% (v/v) in order to get better mechanical properties. Adjustment of pH from pH 2.0 to 4.0 with NaOH (0.1 M) prevented NAu-2 dissolution when added in the silica sol. Mineral colloidal suspension was mixed with the sol to give a final concentration equaled to $0.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ HSG. The pH was further increased up to pH 5.0 (NaOH, 0.1 M) to accelerate self-condensation and sol-gel transition. Hybrid silica solution ($250 \mu\text{L}$) was distributed into 96-well microplates (Eppendorf Deepwell) and left at room temperature for gelation that occurred within minutes. HSGs pieces were then sterilized twice by autoclaving in Milli-Q

water for 30 min at 110 °C and stored in Milli-Q water at ambient temperature until use. The hydrothermal treatment discarded ethanol produced during preparation and stabilized the gel structure (SAXS measurements not shown). HSGs mineral-free (controls) were made according to the same procedure by replacing mineral suspension with Milli-Q water. All chemicals used were of extra pure grade.

Weathering experiments

Biotic experiments

Pantoea agglomerans PA1 and *R. aquatilis* RA1 were isolated from the rhizosphere of beech and wheat, respectively. *Burkholderia* sp. G5 was isolated from podzol soil (Vosges, France; Balland *et al.*, 2010; Grybos *et al.*, 2011). Selected clones were grown overnight in 2 mL sterilized Luria–Bertani broth at 28 °C under constant shaking at 150 r.p.m. (Stuart Scientific, orbital incubator SI50). The cell suspensions were harvested by centrifugation (Multifuge 1 S-R, Heraeus) at 4500 g for 10 min at 10 °C, and the pellets were washed three times in a Fe–Mg-deficient Bushnell–Hass medium (BHm) adjusted at pH 6.5 (Balland *et al.*, 2010; Grybos *et al.*, 2010). BHm medium was prepared with analytical reagents and double deionized water (Milli-Q) and contained per liter: 22.5 mg Na₂HPO₄·2H₂O, 20 mg NaH₂PO₄·2H₂O, 20 mg KCl, 100 mg KNO₃, 65 mg (NH₄)₂ SO₄, 20 mg CaCl₂·2H₂O. Prior to experiments, BHm was autoclaved for 30 min at 110 °C and supplemented with sterile-filtered (0.22 mm pore size membrane; Millipore) glucose solution to a final concentration of 3.3 g L⁻¹. Preliminary experiments on BIOLOG[®] demonstrated that glucose was used by the three bacteria. Two milliliters BHm was used to inoculate each assay containing four pieces of 250 µL HSGs doped with NAu-2 or SWy-2 particles. At the start of the experiment, bacterial density was around 10⁷ cells µL⁻¹ (0.06 absorbance units at 600 nm). pH, Fe, glucose and organic acids were analyzed after 6 and 12 days incubation.

Abiotic experiments

To simulate proton-promoted dissolution, abiotic weathering experiments were performed in BHm medium adjusted with HNO₃ (1 M) to pH ranging from 1.5 to 5.0. HSGs doped with NAu-2 or SWy-2 particles were added in pH-adjusted BHm in a volume ratio 1 : 2. After 6 and 12 days, Fe and pH measurements were determined.

Biotic and abiotic experiments were performed with HSG mineral-free for Fe measurements controls. All weathering experiments were performed in 14-mL sterile

tube (Falcon™) in triplicate at 28 °C under shaking at 150 r.p.m. (Stuart Scientific, orbital incubator SI50).

Elemental analyses

All solutions from weathering experiments were filtered through 0.22-µm pore size filter (Millipore). Elemental analyses were performed on fresh filtered solutions or, after storage at -20 °C, for organic acids analysis. The pH was measured using standard pH meter electrode (MeterLab[®], pHM210). The colorimetric analysis of glucose and Fe was performed in clear bottom 96-well microplates using a FLX Xenius spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). Glucose consumption was determined by measuring the glucose remaining in 3 µL of filtrate aliquot after addition of 300 µL of GOD-PAP (enzymatic Kit; BioLabo). After 20 min in dark, the glucose concentration was calculated through absorbance measurement at 505 nm.

As Fe can precipitate and/or adsorb onto the silica and mineral surfaces, one volume HSG was treated with two volumes of potassium chloride and hydroxylamine (KCl 1 M; NH₂OH 0.2%) to extract amorphous Fe at the end of each experiment. After 1 h at 28 °C, amorphous Fe extracted from HSG with potassium chloride and hydroxylamine solution and soluble Fe in weathering solutions were quantified by absorbance measurement at 565 nm after addition of 20 µL of Ferrospectral[®] dye indicator to 200 µL of filtered solutions (Balland *et al.*, 2010; Grybos *et al.*, 2010; Oulkadi *et al.*, 2014). The detection limit was found as low as 20 µg L⁻¹ under our conditions. The total amount of clay-dissociated Fe was calculated as the sum of soluble Fe and Fe released from HSG after KCl-Hydroxylamine treatment.

Organic acids produced from biotic experiments were quantified using Ion Chromatograph (ICS 3000; Dionex Corp.) equipped with an online hydroxide eluent generator, an ion suppressor, and a conductivity detector. The separation was realized using an Ion Pac[®] column (AS 11 HC; Dionex Corp.) with a KOH gradient of 0.9–60 mM over 50 min at a flow rate of 1.3 mL min⁻¹. Standard solutions (0.1 mM) used were sodium acetate, sodium citrate, sodium formate, sodium gluconate, sodium D, L-malate, sodium oxalate, sodium propionate, sodium succinate (Sigma-Aldrich), sodium lactate, and sodium malonate (Fluka). Quantification measurement uncertainty was better than 0.5% for all organic acids, and the detection limit was close to 0.1 µg mL⁻¹.

Assay for siderophore production

The quantification of siderophores produced by *R. aquatilis* RA1, *P. agglomerans* PA1, and *Burkholderia* sp. G5 was performed according to the Chrome Azurol S (CAS)

liquid assay (Schwyn & Neilands, 1987) after 6 days incubation at 28 °C in liquid MM9 medium. The MM9 growth medium was derived from M9 medium by decreasing the phosphates level to 0.03% KH₂PO₄, and it is composed of (per liter) 6.0 g Na₂HPO₄, 0.3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 1.0 g NH₄Cl, and 6.06 g Tris base (50 mM). Each liter of salt solution was supplemented with sterilized filtered solutions of 10% (w/v) Chelex 100-treated Casamino acids (Difco Laboratories) 20 mL, MgSO₄ (1 M) 2 mL, 20% (w/v) glucose 10 mL, and CaCl₂ (1 M) 0.1 mL (Kalinowski *et al.*, 2000). Siderophore concentration was determined at 630 nm according to a calibration curve made with desferrioxamine mesylate (DFOM; Sigma-Aldrich; Payne, 1994; Oulkadi *et al.*, 2014).

Data analysis

For data multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Tukey's HSD tests using XLSTAT Version 2011.4.02 ($P < 0.05$).

Bacterial strains characterization

The genus of the three bacterial strains selected for this work was determined by amplification of 16S rRNA genes and sequencing. Polymerase chain reactions were performed using an universal set of primers in a total reaction volume of 50 µL containing 1× PCR mastermix (Eppendorf®), 0.1 µM of primers (966 and 1401 F) and 1 µL cell extract (Felske *et al.*, 1998). Before being sequenced by MWG biotech Company (Courtaboeuf,

France), the PCR products (PCR product size: 433 bp) were purified and concentrated using mini-columns (High Pure™ PCR product Purification Kit; Roche diagnostic). A blast program was used to compare sequences with those of GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). The following identification was made with a maximum identification of about 99%: *R. aquatilis* RA1 (ENA accession number HG325834), *P. agglomerans* PA1 (ENA accession number HG325835), *Burkholderia* sp. G5 (ENA accession number HG325836).

Results

SWy-2 and NAu-2 mineral weathering was performed in a Fe–Mg-deprived medium (BHm) supplemented with glucose as sole carbon source. *Burkholderia* sp. G5 consumed all the glucose available after 6 days incubation, while *P. agglomerans* PA1 and *R. aquatilis* RA1 consumed < 50% glucose after 12 days (Table 1). In relation with high glucose uptake by *Burkholderia* sp. G5 after 6 days incubation, the pH values dropped from 6.5 to 2.91 and 2.93 in NAu-2 and SWy-2 treatments, respectively, and then stabilized until 12 days (Table 1). After 12 days incubation, *R. aquatilis* RA1 acidified down to pH 3.74 and pH 4.01 for the SWy-2 and NAu-2 samples, respectively. For all the experiments performed with *P. agglomerans* PA1, the pH values dropped from 6.5 to around pH 3.6 after 6 days up to 12 days (Table 1).

As a consequence of bacterial metabolic activity, Fe mineral dissolution was observed in all treatments (Table 1). 8.15 mg g⁻¹ of total Fe was dissociated from

Table 1. General composition of medium containing HSGs doped with minerals (NAu-2, SWy-2) after 6 and 12 days incubation with three bacteria strains (*Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoea agglomerans* PA1, and *Burkholderia* sp. G5) including glucose remaining in solution, pH, soluble and immobilized Fe

Mineral	Bacteria	Time (days)	pH		Glucose* remaining		Fe [†] soluble		Fe [†] immobilized	
			pH	SD pH	Glucose	SD glucose	Fe	SD Fe	Fe	SD Fe
NAu-2	RA1	6	4.33 ^a	0.04	2.16 ^a	0.26	0.58 ^e	0.15	0.53 ^e	0.06
		12	4.01 ^b	0.15	1.81 ^{a,b}	0.15	2.07 ^c	0.57	1.36 ^d	0.40
	G5	6	2.91 ^d	0.01	–	–	2.65 ^b	0.05	2.60 ^{b,c}	0.31
		12	2.94 ^d	0.01	–	–	4.31 ^a	0.34	3.84 ^a	0.19
	PA1	6	3.61 ^c	0.04	1.97 ^{a,b}	0.28	1.38 ^d	0.13	1.96 ^c	0.44
		12	3.62 ^c	0.07	2.15 ^a	0.07	2.52 ^{b,c}	0.23	2.73 ^b	0.26
SWy-2	RA1	6	3.67 ^c	0.04	1.79 ^{a,b}	0.07	–	–	0.42 ^e	0.04
		12	3.74 ^c	0.18	1.63 ^b	0.52	0.07 ^{e,f}	0.04	0.55 ^e	0.04
	G5	6	2.93 ^d	0.01	–	–	0.14 ^{e,f}	0.03	0.84 ^{d,e}	0.06
		12	2.95 ^d	0.01	–	–	0.14 ^{e,f}	0.05	0.49 ^e	0.03
	PA1	6	3.66 ^c	0.03	1.96 ^{a,b}	0.09	–	–	0.43 ^e	0.03
		12	3.56 ^c	0.03	1.90 ^{a,b}	0.18	0.08 ^{e,f}	0.06	0.60 ^e	0.03

Means not followed by the same letter are significantly different according to Tukey's HSD test ($P < 0.05$), $N = 36$ observations.

*Glucose average concentration remaining in solution expressed in g L⁻¹.

†Fe average concentration expressed in mg g⁻¹ mineral, standard deviation: 'SD' calculated from triplicate.

–, Below detection limit.

NAu-2 particles after 12 days incubation with *Burkholderia* sp. G5, whereas 5.25 and 3.43 mg g⁻¹ were released by *P. agglomerans* PA1 and *R. aquatilis* RA1, respectively (Table 1). Fe leached from low-iron montmorillonite (SWy-2) was in the range 0.62–0.98 mg g⁻¹ after 12 days (Table 1). To take into account the eightfold Fe level in NAu-2 compared with SWy-2, Fe leached was normalized to total Fe (Fig. 2). An average Fe release value of 2.0% was obtained after 12 days bioweathering except for NAu-2 incubated with *Burkholderia* sp. G5 and *P. agglomerans* PA1 that released 3.25% and 1.35% Fe, respectively. Lower soluble Fe values were systematically obtained during SWy-2 bioweathering (Fig. 2). According to abiotic experiments (Fig. 3a and b), it appeared that, except for SWy-2 bioweathering by *Burkholderia* sp. G5, all biotic treatments were above the proton-promoted dissolution line released in BHm medium adjusted with HNO₃ (1 M) to pH ranging from 1.5 to 5.0 which indicated the effect of ligand-promoted dissolution. Strong Fe chelatants, that is siderophores, were measured in MM9 treatments for *R. aquatilis* RA1 and *Burkholderia* sp. G5 giving 52 ± 0.3 and 45 ± 1.2 mM (equivalent DFOM), respectively, whereas *P. agglomerans* PA1 produced 16 ± 1.5 mM (equivalent DFOM). Determination of

other ligands, that is LMWOA (Table 3), gave for *R. aquatilis* RA1 and *P. agglomerans* PA1 high amount of lactic and acetic acids (< 300 mM) and moderate levels of other monodentate acids, that is, succinic, propionic and formic acids. Di and tri-dentate, that is oxalic and citric acids, were produced up to 200 mM for *P. agglomerans* PA1 after 12d incubation with NAu-2 (Table 2). High concentration of gluconic acid (> 9000 mM) was produced by *Burkholderia* sp. G5 in NAu-2 and SWy-2 weathering experiments with some acetic, formic, propionic and oxalic acids in micromolar concentrations. No lactic, citric, pyruvic acids were produced by G5 after 12 days. The metabolized carbon was calculated from carbon produced in organic acids normalized to carbon consumed in glucose (Table 3). In NAu-2 and SWy-2 bioweathering experiments, metabolized C after 12 days represented more than 60% for *Burkholderia* sp. G5 and <4% and 6% for *R. aquatilis* RA1 and *P. agglomerans* PA1, respectively.

Discussion

The HSG methodology permitted to evaluate bacterial Fe leaching from two colloidal phyllosilicates (Fig. 2).

Fig. 2. Soluble Fe (in white) and immobilized Fe (in gray; in g 100 g⁻¹ Fe) released by *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoea agglomerans* PA1, and *Burkholderia* sp. G5 from colloidal minerals trapped in HSGs after 12 days incubation at 28 °C. Means not followed by the same letter are significantly different according to Tukey's HSD test ($P < 0.05$), $N = 36$ observations.

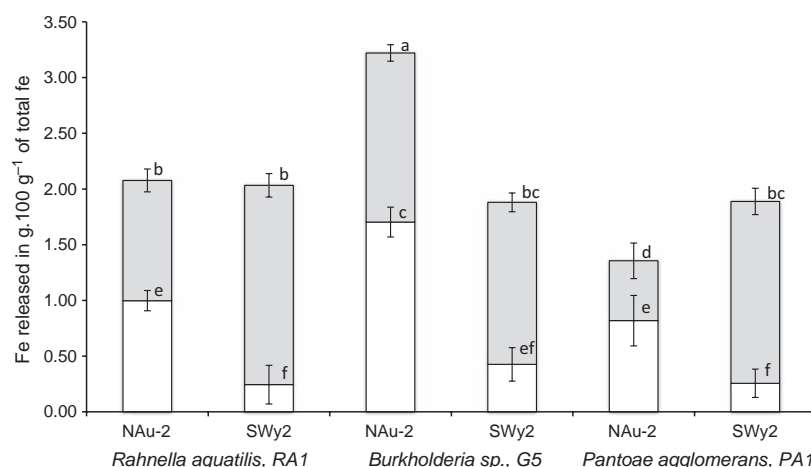


Fig. 3. Log–Log plots of Fe released in solution (mol g⁻¹ mineral) versus pH from HSGs containing SWy-2 (a) and NAu-2 (b) after 12 days of incubation at 28 °C with *Rahnella aquatilis* RA1 (black square), *Pantoea agglomerans* PA1 (black diamond), and *Burkholderia* sp. G5 (black triangle). The proton-promoted dissolution from HNO₃ experiments (empty square) is indicated by dashed line.

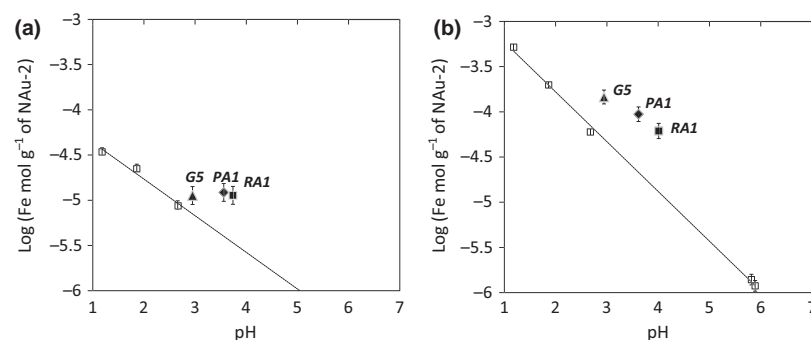


Table 2. Major organic acids excreted by bacteria strains *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoea agglomerans* PA1, and *Burkholderia* sp. G5) after 6 and 12 days incubation of HSG doped with minerals (NAu-2 and SWy-2)

Mineral	Bacteria	Time (days)	Gluconic acid*	Citric acid*	Succinic acid*	Lactic acid*	Acetic acid*	Propionic acid*	Oxalic acid*	Formic acid*	Pyruvic acid*	
NAu-2	RA1	6	–	47.9 ^b	11.3 ^{b,c}	51.4 ^{d,e}	76.6 ^c	10.8 ^b	28.9 ^{e,f}	8.0 ^e	–	
			–	7.3	2.7	9.4	2.9	3.3	1.9	1.2	–	
		12	–	84.6 ^a	46.6 ^{a,b,c}	55.8 ^{d,e}	141.6 ^{a,b,c}	14.4 ^b	41.1 ^{d,e}	13.03 ^{c,d,e}	–	
			–	32.1	18.0	3.4	3.4	1.0	4.8	2.2	–	
		G5	6	11633 ^a	–	–	–	80.5 ^c	9.9 ^b	3.3 ^g	10.9 ^{d,e}	–
				396.5	–	–	–	10.0	2.0	0.5	2.1	–
	12	11733 ^a	970.1	–	2.2 ^c	–	116 ^{b,c}	3.8 ^b	10 ^{f,g}	21.03 ^{c,d,e}	–	
			–	2.0	–	18.0	2.3	1.0	2.5	–		
	PA1	6	37.7 ^d	39.4 ^{b,c}	92.2 ^{a,b}	182.3 ^{a,b}	146.5 ^{a,b,c}	9.4 ^b	152.2 ^b	92.0 ^b	–	
			10.2	2.7	14.6	15.9	14.5	2.3	16.8	12.7	–	
	12	35.5 ^c	55.4 ^{a,b}	99.3 ^a	200 ^{a,b}	298.3 ^a	5.8 ^b	199 ^a	128.3 ^a	11.3 ^a		
			6.3	4.7	15.0	18.8	37.2	2.4	16.3	9.5	9.1	
SWy-2	RA1	6	–	94.6 ^a	68.9 ^{a,b,c}	92.2 ^{c,d}	68.3 ^c	12.5 ^b	36.3 ^{d,e}	7.2 ^e	–	
			–	13.7	14.0	18.3	2.9	2.9	4.2	1.2	–	
		12	–	81.6 ^{a,b}	20.3 ^{a,b,c}	153.6 ^{b,c}	285.3 ^a	12.1 ^b	41.1 ^{d,e}	8.7 ^e	23.8 ^a	
			–	33.5	10.0	39.0	39.2	4.9	4.8	2.2	10.8	
		G5	6	9526 ^b	–	–	–	60.5 ^c	32.4 ^a	10 ^{f,g}	11.6 ^{d,e}	–
				584.9	–	–	–	1.9	16.3	1.1	3.3	–
	12	11300 ^a	519.4	–	5.7 ^c	–	83.3 ^c	12.1 ^b	3.3 ^g	10.2 ^e	–	
			–	1.5	–	2.1	2.7	0.5	1.2	–		
	PA1	6	–	70.3 ^{a,b}	117.33 ^a	144 ^{b,c}	110 ^{b,c}	6.25 ^b	57.0 ^{c,d}	25.3 ^{c,d}	–	
			–	9.7	31.7	34.8	6.0	1.5	7.1	3.3	–	
	12	–	78.4 ^{a,b}	80.5 ^{a,b,c}	258 ^a	258.3 ^{a,b}	8.1 ^b	70.7 ^c	27.5 ^c	59.4 ^a		
			–	16.9	17.5	55.3	59.3	1.4	4.5	2.5	29.4	

Means not followed by the same letter are significantly different according to Tukey's HSD test ($P < 0.05$), $N = 36$ observations. Standard deviations calculated from triplicate are indicated in italic below each mean value.

*Organic acid average concentration expressed in micromolar ($n = 3$).

–, Below detection limit.

Table 3. Metabolized carbon (%) by *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoea agglomerans* PA1, and *Burkholderia* sp. G5 during NAu-2 and SWy-2 bioweathering

	Metabolized Carbon (C in %) during bioweathering			
	NAu-2 HSG experiments		SWy-2 HSG experiments	
	C (%)	SD	C (%)	SD
<i>Rahnella aquatilis</i> RA1	2.64	0.04	3.23	0.17
<i>Burkholderia</i> sp. G5	64.05	–	61.86	–
<i>Pantoea agglomerans</i> PA1	5.68	0.08	5.26	0.11

The percentage values were calculated from carbon produced in organic acids normalized to carbon consumed in glucose after 12 days at 28 °C.

Ligand-promoted dissolution was observed in all cases except for SWy-2 bioweathering with *Burkholderia* sp. G5 that followed proton-promoted dissolution processing (Fig. 3a and b). The acidifying bacterial activity resulted from organic acids production but also from CO₂ release that was not measured in this study (Welch & Ullman, 1993; Balland et al., 2010). Two distinct organic acids

profiles were observed as a function of bacteria ecological origin. From acidic podzol type soil, *Burkholderia* sp. G5 metabolized more than 60% carbon and produced mainly gluconate (10 000 μM), while *R. aquatilis* RA1 and *P. agglomerans* PA1, isolated from silicate-rich rhizosphere, metabolized < 6% carbon and produced moderate levels (< 300 μM) of mono, di- and tri-dentate organic acids. Previous studies showed that bacteria such as *Burkholderia* sp. efficiently decreased pH (pH < 3) in poor-nutrients conditions to acquire metals from minerals by glucose oxidation and gluconic acid production (Vandevivere et al., 1994; Lin et al., 2006; Wu et al., 2007; Song et al., 2008; Balland et al., 2010; Grybos et al., 2011; Balland-Bolou-Bi & Poszwa, 2012). Vandevivere et al. (1994) used the term gluconate-promoted dissolution to describe the central role of gluconic acid on silicate mineral weathering as also previously reported in other works (Welch & Ullman, 1999; Lin et al., 2006; Mailloux et al., 2009). The di- and tri-dentate organic acids, produced by *R. aquatilis* RA1 and *P. agglomerans* PA1, were also found efficient in silicate dissolution in conditions of pH ranging from 3.6 to 4.3 (Welch &

Ullman, 1993). Citric and oxalic acids are characterized by Fe(III)-binding affinity constants of $10^{+24.8}$ and $10^{+7.6}$, respectively (Neilands, 1981; Silva *et al.*, 2009). Other chelating agents, which is siderophores, were produced in micromolar concentrations by *R. aquatilis* RA1, *Burkholderia* sp. G5 and *P. agglomerans* PA1. Siderophores have a high coordination affinity with ferric ions and a binding constant varying between 10^{+23} and 10^{+52} (Ams *et al.*, 2002; Sandy & Butler, 2009). Organic acids and siderophores can also bind to other elements of minerals than Fe. Adsorption of siderophores molecules on clay mineral surfaces entrapped in HSG and formation of stable and soluble metal-organic complexes might act efficiently in our weathering experiments (Welch & Ullman, 1999; Ullman & Welch, 2002; Cama & Ganor, 2006; Haack *et al.*, 2008). Under aerated conditions at pH 5.0, inorganic iron is extremely insoluble and its concentration is less than optimal for microbial growth. To overcome this limitation, *Burkholderia* sp. G5, *R. aquatilis* RA1 and *P. agglomerans* PA1 were expected to produce early siderophores that have a high coordination affinity with ferric ions. In addition, synergistic mechanisms with LMWOA could occur at the mineral surface, as demonstrated in experiments dealing with Fe(III) and oxalate and DFOM (Cheah, 2003; Reichard *et al.*, 2007). Acker and Bricker (1992) suggested that mineral 'controlled' the organic acids production in relation to Fe localization in octahedral or tetrahedral sheet. Fe is essentially found in octahedral sheet for Swy-2, while N Au-2 contains mainly octahedral Fe and some tetrahedral Fe (Gates *et al.*, 2002; Vantelon *et al.*, 2003; Michot *et al.*, 2008). Grybos *et al.* (2010) showed that in the case of N Au-2, proton-promoted dissolution involved the leaching of octahedral Fe from edge surfaces and tetrahedral Fe from basal surfaces. The average percentage of total Fe release from both minerals in our experiments revealed the efficiency of the two distinct bacterial metabolic profiles representative of two soil origins, that is, poor acidic and organic-rich soils.

Conclusion

Hybrid silica gel methodology was a novel way of separating cells from a colloidal mineral source. The ligands diffuse through HSG and dissolve the minerals. In this work, *P. agglomerans* PA1 and *R. aquatilis* RA1 showed clearly ligand-promoted dissolution type behavior by producing moderate acidification and efficient ligands that is di-, tri-dentate organic acids, and siderophores. *Burkholderia* sp. G5, selected from acidic podzolic soils, acidified the medium down to pH < 3.0 by producing large amounts of gluconic acid. The nature and concentration of organic acids produced in our experiments

reflected the distinct ecological origin of bacteria, which is rhizosphere or podzolic soils that usually contains from 0.1 to 1000 mM LMWOA. Rhizospheric soils are silicate-rich soils where microorganism metabolites and root exudates contribute to bioweathering by acidifying, changing redox conditions, or chelating nutrients. HSG permitted to prevent cell attachment and biofilm formation on mineral surfaces and facilitate the quantification of biogeochemical processes. Studying the influence of root exudate addition on the bioweathering efficiency of rhizospheric bacteria should be relevant in further HSG experiments. Further investigations are also necessary to get details about a size exclusion function for organic ligands. Changing silica precursors nature (i.e., MTMS: methyltrimethoxysilane precursor) should provide variations in silica surface hydrophobicity and ligands partition. Screening different classes of organic acids as a function of size or polarity should be of great interest to delineate the complex bioweathering processes.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (Program HÆSPRI ANR-09-BLAN-0336), Region Lorraine and Université de Lorraine. All of these are gratefully acknowledged.

Reference

- Acker JG & Bricker OP (1992) The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature. *Geochim Cosmochim Acta* **56**: 3073–3092.
- Ams DA, Maurice PA, Hersman LE & Forsythe JH (2002) Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chem Geol* **188**: 161–170.
- Balland C, Poszwa A, Leyval C & Mustin C (2010) Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. *Geochim Cosmochim Acta* **74**: 5478–5493.
- Balland-Bolou-Bi C & Poszwa A (2012) Effect of calco-magnesian amendment on the mineral weathering abilities of bacterial communities in acidic and silicate-rich soils. *Soil Biol Biochem* **50**: 108–117.
- Banfield JF, Barker WW, Welch SA & Taunton A (1999) Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *P Natl Acad Sci USA* **96**: 3404–3411.
- Barker WW, Welch Susan A & Banfield Jillian F (1997) Biogeochemical weathering of silicate minerals. *Rev Mineral Geochem* **35**: 391–428.
- Bennett PC, Rogers JR & Choi WJ (2001) Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. *Geomicrobiol J* **18**: 3–19.
- Berthelin J (1983) Microbial weathering process. *Microbial Geochemistry*, pp. 223–262. Blackwell, London.

- Cama J & Ganor J (2006) The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: a case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochim Cosmochim Acta* **70**: 2191–2209.
- Cheah S (2003) Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. *Chem Geol* **198**: 63–75.
- Dickson DJ & Ely RL (2013) Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria, lessons for academic and applied research. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 1809–1819.
- Dong HL & Lu AH (2012) Mineral–microbe interactions and implications for remediation. *Elements* **8**: 95–100.
- Dong HL, Jaisi DP, Kim J & Zhang GX (2009) Microbe–clay mineral interactions. *Am Mineral* **94**: 1505–1519.
- Felske A, Akkermans ADL & De Vos WM (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4581–4587.
- Furrer G & Stumm W (1986) The coordination chemistry of weathering. 1. Dissolution kinetics of delta-Al₂O₃ and BeO. *Geochim Cosmochim Acta* **50**: 1847–1860.
- Gates WP, Slade PG, Manceau A & Lanson B (2002) Site occupancies by iron in nontronites. *Clays Clay Miner* **50**: 223–239.
- Grybos M, Michot Laurent J, Skiba M, Billard P & Mustin C (2010) Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. *J Colloid Interface Sci* **343**: 433–438.
- Grybos M, Billard P, Desobry-Banon S, Michot LJ, Lenain JF & Mustin C (2011) Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. *J Colloid Interface Sci* **362**: 317–324.
- Haack EA, Johnston CT & Maurice PA (2008) Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe³⁺. *Geochim Cosmochim Acta* **72**: 3381–3397.
- Hider RC & Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **27**: 637–657.
- Hiebert FK & Bennett PC (1992) Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. *Science* **258**: 278–281.
- Jaisi DP, Kukkadapu RK, Eberl DD & Dong HL (2005) Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. *Geochim Cosmochim Acta* **69**: 5429–5440.
- Jaisi DP, Dong H & Liu C (2007a) Kinetic analysis of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. *Environ Sci Technol* **41**: 2437–2444.
- Jaisi DP, Dong H & Liu C (2007b) Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochim Cosmochim Acta* **71**: 1145–1158.
- Jaisi DP, Dong H, Kim J, He Z & Morton JP (2007c) Nontronite particle aggregation induced by microbial Fe(III) reduction and exopolysaccharide production. *Clays Clay Miner* **55**: 96–107.
- Jaisi DP, Ji SS, Dong H, Blake RE, Eberl DD & Kim J (2008) Role of microbial Fe(III) reduction and solution chemistry in aggregation and setting of suspended particles in the Mississippi river & delta; plain Louisiana, USA. *Clays Clay Miner* **56**: 416–428.
- Kalinowski BE, Liermann LJ, Givens S & Brantley SL (2000) Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chem Geol* **169**: 357–370.
- Lin TF, Huang HI, Shen FT & Young CC (2006) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-AL74. *Bioresour Technol* **97**: 957–960.
- Mailloux BJ, Alexandrova E, Keimowitz AR et al. (2009) Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2558–2565.
- Michot LJ, Bihannic I, Maddi S, Baravian C, Levitz P & Davidson P (2008) Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the I/N transition. *Langmuir* **24**: 3127–3139.
- Neilands JB (1981) Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* **50**: 715–731.
- Oulkadi D, Balland-Bolou-Bi C, Michot LJ, Grybos M, Billard P, Mustin C & Banon S (2014) Bioweathering of nontronite colloids in hybrid silica gel: implications for iron mobilization. *J Appl Microbiol* **116**: 325–334.
- Payne SM (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol* **235**: 329–344.
- Reichard PU, Kretzschmar R & Kraemer SM (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochim Cosmochim Acta* **71**: 5635–5650.
- Rogers JR & Bennett PC (2004) Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chem Geol* **203**: 91–108.
- Sandy M & Butler A (2009) Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chem Rev* **109**: 4580–4595.
- Schwyn B & Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal Biochem* **160**: 47–56.
- Silva AMN, Kong X, Parkin MC, Cammack R & Hider RC (2009) Iron (III) citrate speciation in aqueous solution. *Dalton Trans* **10**: 8616–8625.
- Song O, Seung-Jin Lee, Lee Y, Sang-Cheol Lee, Kim K & Choi Y (2008) Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA 23 isolated from cultivated soil. *Braz J Microbiol* **39**: 151–156.
- Stucki JW (2011) A review of the effects of iron redox cycles on smectite properties. *CR Geosci* **343**: 199–209.
- Ullman WL & Welch SA (2002) Organic ligands and feldspar dissolution. *Water–Rock Interactions, Ore Deposits, and*

- Environmental Geochemistry* (Hellmann R & Wood SA, eds), pp. 3–35. The Geochemical Society, Washington.
- Vandevivere P, Welch SA, Ullman WJ & Kirchman DL (1994) Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near neutral pH. *Microb Ecol* **27**: 241–251.
- Vantelon D, Montarges-Pelletier E, Michot LJ, Briois V, Pelletier M & Thomas F (2003) Iron distribution in the octahedral sheet of dioctahedral smectites. An Fe K-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Phys Chem Miner* **30**: 44–53.
- Welch SA & Ullman WJ (1993) The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochim Cosmochim Acta* **57**: 2725–2736.
- Welch SA & Ullman WJ (1999) The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 C and 35 C. *Geochim Cosmochim Acta* **63**: 3247–3259.
- Wu L, Jacobson A, Chen H & Hausner M (2007) Characterization of elemental release during microbe–basalt interactions at T = 28 °C. *Geochim Cosmochim Acta* **71**: 2224–2239.

Annexe II : Multicolor Whole-Cell Bacterial Sensing Using a Synchronous Fluorescence Spectroscopy-Based Approach

CopyRights : PLoS ONE 10(3): Mars, 2015 - DOI:10.1371/journal.pone.0122848

RESEARCH ARTICLE

Multicolor Whole-Cell Bacterial Sensing Using a Synchronous Fluorescence Spectroscopy-Based Approach

Damien Parrello¹, Christian Mustin¹, David Brie², Sebastian Miron², Patrick Billard^{1*}

1 Université de Lorraine, CNRS, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **2** Université de Lorraine, CNRS, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN) UMR 7039, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* patrick.billard@univ-lorraine.fr



Abstract

The wide collection of currently available fluorescent proteins (FPs) offers new possibilities for multicolor reporter gene-based studies of bacterial functions. However, the simultaneous use of multiple FPs is often limited by the bleed-through of their emission spectra. Here we introduce an original approach for detection and separation of multiple overlapping fluorescent signals from mixtures of bioreporters strains. The proposed method relies on the coupling of synchronous fluorescent spectroscopy (SFS) with blind spectral decomposition achieved by the Canonical Polyadic (CP) decomposition (also known as Candecomp/Parafac) of three-dimensional data arrays. Due to the substantial narrowing of FP emission spectra and sensitive detection of multiple FPs in a one-step scan, SFS reduced spectral overlap and improved the selectivity of the CP unmixing procedure. When tested on mixtures of labeled *E. coli* strains, the SFS/CP approach could easily extract the contribution of at least four overlapping FPs. Furthermore, it allowed to simultaneously monitor the expression of three iron responsive genes and pyoverdine production in *P. aeruginosa*. Implemented in a convenient microplate format, this multiplex fluorescent reporter method provides a useful tool to study complex processes with different variables in bacterial systems.

OPEN ACCESS

Citation: Parrello D, Mustin C, Brie D, Miron S, Billard P (2015) Multicolor Whole-Cell Bacterial Sensing Using a Synchronous Fluorescence Spectroscopy-Based Approach. PLoS ONE 10(3): e0122848. doi:10.1371/journal.pone.0122848

Academic Editor: Suzanne Fleiszig, UC Berkeley, UNITED STATES

Received: November 28, 2014

Accepted: February 19, 2015

Published: March 30, 2015

Copyright: © 2015 Parrello et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) project H/ESPRI (ANR-09-BLAN-0336-04). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Introduction

Fluorescent proteins (FPs) have become valuable tools for investigating biological processes in living cells. Their unique ability to emit fluorescence in both eukaryotic and prokaryotic cells with no substrate or cofactor requirement makes them suitable biochemical markers for a variety of biological applications. FPs are regularly used, for instance, as reporters for non-invasive monitoring of gene expression as well as for studying subcellular localization and dynamics of proteins [1]. In ecological studies, they can serve as tags to track bacteria in complex environmental matrices such as biofilms or soils, and to survey mutualistic or pathogenic associations that bacteria form with plants or animals [2]. Another broad application area is the development of whole cell bacterial sensors, which typically relies on gene fusions between a stress

responsive promoter and a reporter gene (e.g., green fluorescence protein (GFP)). With the advances in the emerging field of synthetic biology, FPs are now commonly used as output reporters to quantify the dynamic behavior of biological components from artificial genetic circuits [3][4].

The last decade has seen the emergence of a wide variety of new FP variants with fluorescence emission ranging from blue to near infrared and featuring, even in a same spectral category, improved photophysical properties including brightness, fluorophore maturation rate and photostability. The availability of such an ever growing collection of FPs offers the opportunity for multicolor labeling studies, where different components of biological systems and their interactions can be monitored simultaneously by mean of micro- or spectroscopic techniques [5][6]. However, the combined use of multiple FPs is often limited by the overlaps among their fluorescence spectra. While the simultaneous detection of two or three spectrally distant FPs is commonly achieved using appropriate optical filters, significant spectral overlaps inevitably appear as the number of FPs increases, thereby complicating the accurate separation of individual signals in the mixture. In fluorescence imaging, this limitation can be overcome through linear unmixing approaches, which determine the contribution of each fluorophore in the overall fluorescence data, assuming that the mixed spectrum is a the linear combination of the reference spectra of all involved fluorophores [7][8]. To do so, the spectral properties of each spectrum component must be known for reliable spectral unmixing. This is however rarely the case in biological systems since the spectra of fluorophores are subject to experimental and biological fluctuations (e.g. cell type, pH, temperature) and may differ from the reference ones. Furthermore, inherent cellular autofluorescence and background fluorescence should be defined spectrally before unmixing calculation to be subtracted from the actual fluorophore signals. Several alternative methods allowing blind spectral separation of multiple unknown fluorescent sources have been proposed, among which we may cite Principal Component Analysis (PCA) or Non Negative Matrix Factorization (NMF) [9]. A multidimensional extension of these bilinear decompositions is the Canonical Polyadic (CP) decomposition or Candecomp/Parafac [10][11] which has the advantage of yielding a unique solution in most cases [12][13][14]. This uniqueness feature, along with the blindness of the algorithm makes CP an attractive exploratory tool that generally provides significant insights about the underlying structure of the spectral data. While the method has gained interest in chemometrics and food technology, applications to quantify fluorophores in biological systems are still scarce [15].

In this context, the present study aimed at developing a method for the recording and analysis of multiple fluorescent signals from mixtures of whole cell bioreporters. The approach relies on the acquisition of spectra by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) combined with blind CP decomposition of the fluorescence data to discriminate FP signals from autofluorescence or extrinsic fluorescent compounds. Recording fluorescence spectra through synchronous scanning of both excitation and emission wavelengths is known to provide narrower and more symmetric spectra in a wider spectral range [16]. This scan functionality results in a higher spectral selectivity for the monitoring of fluorescence sources. By reducing spectral bleed through, SFS serves as a simple and useful method for the simultaneous determination of fluorescent components in complex mixtures [17]. In the present work, we first applied the combined SFS/CP approach to mixtures of *E. coli* strains expressing fluorescent proteins with overlapping spectra. The method was then used to monitor the expression of iron responsive genes and siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in [Table 1](#). Bacteria were routinely grown aerobically on LB agar or in LB broth. Deferrated casamino acids medium (DCAA medium [18]) was used in iron sensing assays with *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were grown at 37°C. When required, the medium was supplemented with kanamycin at final concentrations of 40 µg/ml (for *E. coli*) or 250 µg/ml (for *P. aeruginosa*).

Detailed methods for construction of plasmids used in this work are described in the supporting [S1 Text](#). Briefly, the fluorescent reporter pPB plasmid series was obtained by replacing the *gfp* gene of pPROBE'-*gfp*[LVA] [20] by genes coding 4 different fluorescent reporters (TurboYFP, E2-Orange, DsRedExpress and mCherry). A second set of vectors designated pPB-lac was also constructed by inserting the LacI-repressible *P_{A1/O4/O3}* promoter [23] upstream each reporter gene in pPB plasmids.

General DNA manipulation

DNA manipulations were performed following standard molecular biology techniques. Enzymes were purchased from Thermo Scientific. Plasmids extraction and DNA cleanup were performed by using Nucleospin miniprep and Nucleospin gel and PCR cleanup columns

Table 1. Bacterial strains and plasmids.

Strains and plasmids	Relevant characteristic	Source or reference
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> TOP10	F' <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> (Str ^R) Δ <i>lacX74</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) λ ⁻	Invitrogen
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild type	ATCC 15692
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>pvdA</i>	Pyoverdine-deficient mutant	[19]
Plasmids ^a		
pPROBE'-GFP[LVA]	Broad host-range promoter probe vector; Km ^r	[20]
pPROBE-NT'	Broad host-range <i>gfp</i> promoter probe vector ; Km ^r	[20]
pJBA28	Source of <i>P_{A1/O4/O3}</i> promoter; Ap ^r ; Km ^r	[21]
pPROBE-NT'lac	pPROBE-NT' derivative with <i>gfp</i> driven by <i>P_{A1/O4/O3}</i> ; Km ^r	This study
pmcherry	Source of mCherry coding sequence; Ap ^r	Clontech
pE2-Orange-N1	Source of E2-Orange coding sequence; Km ^r	[22]
pBY538	Promoter probe plasmid carrying <i>E. coli</i> codon optimized TurboYFP; Km ^r	This study
pBO561	Promoter probe plasmid carrying <i>e2-orange</i> ; Km ^r	This study
pBR591	Promoter probe plasmid carrying <i>E. coli</i> codon optimized <i>dsred-express2</i> ; Km ^r	This study
pBR610	Promoter probe plasmid carrying <i>mcherry</i> ; Km ^r	This study
pPB-lac-Y538	pBY538 carrying a <i>P_{A1/O4/O3}.turbo-yfp</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-O561	pBO561 carrying a <i>P_{A1/O4/O3}.e2-orange</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-R591	pBR591 carrying a <i>P_{A1/O4/O3}.dsred-express2</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-lac-R610	pBR610 carrying a <i>P_{A1/O4/O3}.mcherry</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-bfrB-O561	pBO561 carrying a <i>bfrB-e2-orange</i> fusion; Km ^r	This study
pPB-pvdA-R591	pBR591 carrying a <i>pvdA-dsred-express2</i> fusion; Km ^r	This study

^a Individual plasmid names in the set of pPB vectors have the form pPBXyyy, where X and yyy denote the spectral class and the fluorescence emission maximum (in nm) of the encoded FP, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0122848.t001

(Macherey Nagel), respectively. PCR primers were purchased from Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany). PCR amplifications were carried out with DreamTaq DNA Polymerase from Thermo Scientific. All constructs were verified by DNA sequencing (Eurofins Genomics). Plasmids were introduced in *P. aeruginosa* by electroporation following the method of Choi et al. [24].

Mixture of different fluorescent *E. coli* strains

Serial dilutions of cell suspensions were obtained from four different *E. coli* TOP10 strains, each expressing a particular fluorescent protein (GFP, TurboYFP, E2-Orange and DsRed-Express2) constitutively. Cell suspensions were mixed in defined ratios in black 96-well microplates (Eppendorf Microplate 96/V), with a mixing pattern designed to generate a trilinear data set of four overlapping fluorescent signals useable by the signal processing method (Candcomp/Parafac) described below. Mixtures were prepared using an automated pipetting system (Eppendorf epMotion 5070) as follows: overnight LB cultures were washed twice in NaCl 0.8% and cell density was adjusted to $OD_{600} = 2$ (approx. 8.10^8 cells/ml). First, cell suspensions of either TOP10/pPROBE-NT⁺Lac (GFP) or TOP10/pPB-lac-Y538 (TurboYFP) were 1.65-fold serially diluted six times in a deepwell plate (Eppendorf) until reaching a 20 times dilution (1.65^6). Similarly, TOP10/pPB-lac-O561 (E2-Orange) and TOP10/pPB-lac-R591 (DsRed-Express2) were diluted in the same plate but using a 3-fold serial dilution to avoid collinearity between the two sets of dilution. The untransformed TOP10 strain was used as a diluent to maintain a constant cell concentration in the wells. Diluted cell suspensions were then mixed in a second microplate following the ratios indicated [S1 Fig](#). From column 1 to 7 the concentration of fluorescent reporters varied whereas from line A to E the ratios between reporters varied, while the cell density remained constant ($OD_{600} = 2$). Thus, the contribution of each fluorescent protein decreased or increased as a function of the dilution rank or of the mixing ratio. As a benchmark, microplates were prepared following the same pattern for each fluorescent strain mixed with untransformed TOP10 strains.

Mixture of *P. aeruginosa* iron bioreporter strains

Overnight LB cultures of the two iron bioreporters *P. aeruginosa* PAO1/pPB-bfrB-O561 and PAO1/pPB-pvdA-R591 were washed twice in DCAA medium and suspended in the same medium to an OD_{600} of 0.1. The two cell suspensions were then mixed in a black polypropylene 96-well microplate and supplemented with different dilution of $FeCl_3$ with an automated pipetting system (Eppendorf epMotion 5070) in a final volume of 200 μ l as indicated in [S2 Fig](#). Briefly, from column 1 to 12, iron concentration serially decreased 3-fold, from 2 mM $FeCl_3$ (column 1) to 11 nM $FeCl_3$ (column 12). From lane A to G, we linearly varied the ratio of bioreporter suspensions from 95% of PAO1/pPB-bfrB-O561 and 5% of PAO1/pPB-pvdA-R591 (line A) to 5% of PAO1/pPB-bfrB-O561 and 95% of PAO1/pPB-pvdA-R591 (lane G). The microplate was incubated at 37°C with shaking (130 rpm) under humid atmosphere to limit evaporation for 48h before fluorescence measurement.

A second experiment was performed with an additional iron bioreporter strain, PAO1/pPROBE-NT⁺-pvdS, following a similar procedure, except that cell suspensions were mixed in a final volume of 1 ml in 48-well microplates and incubated with 9 different iron concentrations as detailed in [S3 Fig](#).

Synchronous Fluorescence Spectra acquisition

Before fluorescence reading, cell suspensions were briefly homogenized with a MixMate vortex mixer (Eppendorf). Synchronous fluorescence spectra (SFS) were performed in 96 well microplates

using a two-grating monochromator spectrofluorometer FLX-Xenius (SAFAS, Monaco), equipped with a 150 W Xenon lamp as the excitation source. The SFS analysis of cell suspensions was measured in the excitation wavelength range of 400–700 nm at a constant offset value $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 20$ nm, which gave the best sensitivity and sharpest peaks among the tested offsets (i.e. 15, 20, 30, 40 nm). Spectra were recorded with a spectral step of 2 nm and a mean scan speed of 600 nm.min⁻¹. The excitation and emission slits width were 10 nm and the photomultiplier voltage set at values between 650 V. Raw fluorescence signals (without filtering or smoothing) collected from mixtures of *E. coli* and *P. aeruginosa* and exported for further signal processing with Candecomp/Parafac algorithms running under Matlab software.

Synchronous spectrum of purified pyoverdine (Sigma-Aldrich, catalog no. P8124) was measured in a similar way in DCAA medium.

Overnight cultures of *E. coli* TOP10 expressing FP constitutively were also analyzed by synchronous fluorescence spectroscopy for a comparative analysis of *in vivo* FP brightness. Following spectra acquisition, the *in vivo* brightness was estimated from the fluorescence maximum intensity normalized to cell density.

Candecomp/Parafac (CP) decomposition

The multi-way analysis of spectral data by CP algorithm provided multilinear decomposition of a data matrix without any a priori information about the FP spectra. In this work, it was assumed that synchronous fluorescent spectra coming from different batches are indicative of various mixtures of R fluorescent components. Each of the R fluorescent component spectrum, termed as the *r*th source (*r* = 1, . . . , R), is mathematically represented by a vector $\mathbf{s}_r = [s_{r1} \dots s_{rN}]^T$ made of *N* entries, i.e. the fluorescence intensities at each wavelength. Thus, the acquisition of SFS spectra as a function of two crossed parameters (*M* x *P* values; e.g. biosensors ratio x iron concentration) generated a three-way data array \mathcal{X} (three-order tensor; e.g. biosensors ratio x iron concentration x wavelength), which can be expressed by the following tri-linear CP mode:

$$\mathcal{X}_{m,p,n} = \sum_{r=1}^R a_{rm} \cdot b_{rp} \cdot s_{rn} + \mathcal{E}_{m,p,n}$$

where R is the number of fluorescence sources (i.e. decomposition rank). \mathcal{E} is the residual error term (three-order tensor) including experimental error, signal noise or ‘non-linear’ component behavior. An equivalent representation is given by the following equation:

$$\mathcal{X} = [[\mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{S}]] + \mathcal{E}$$

where the three matrices **A** (*M*-by-*R*), **B** (*P*-by-*R*) and **S** (*N*-by-*R*) are respectively obtained by stacking the vectors \mathbf{a}_r , \mathbf{b}_r and \mathbf{s}_r . The main interest of the CP decomposition comes from its good uniqueness properties [12], meaning that the matrices **A**, **B** and **S** can be uniquely estimated from the data \mathcal{X} under mild conditions. Moreover, even in difficult situations such as the presence of collinear vector in one mode (matrix), the addition of supplementary mathematical constraints such as the positivity of the different matrix entries, coupled with unimode uniqueness results of Guo et al. [14] yields a unique non negative CP decomposition. After selecting the expected number of fluorescent sources (R), the estimation of the unknown three matrices (**A**, **B** and **S**) was achieved by a non-negative alternating least-squares algorithm with a random initialization of the three matrices. The code implemented herein was developed by Bro [11] and is available in the Matlab N-way toolbox.

With SFS data set presented herein, performing the tri-linear CP decomposition yields the three matrices **S** (*N*-by-*R* matrix), **A** (*M*-by-*R* matrix), **B** (*P*-by-*R* matrix) representing

respectively estimates of the R source spectra and the corresponding parameters profiles to the M and P values of the two parameters. The rank R of the decomposition (i.e. the number of sources R) is assessed iteratively by observing the decrease of the energy of the fitting error \mathcal{E} as the number of components is increasing.

Results and Discussion

Characterization of FP labeled *E. coli* cells by synchronous fluorescence spectroscopy

Synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) is an increasingly popular tool for analyzing complex mixtures of fluorescent compounds. The combination of SFS with appropriate mathematical data processing tools enables the decomposition of complex fluorescent spectra into their components. To assess the gain provided by SFS compared to conventional fluorescent spectroscopy in differentiating mixtures of fluorescently labeled bacteria, we first recorded the fluorescent spectra of *E. coli* TOP10/pPB-lac by synchronous scanning and compared them to excitation and emission spectra. The pPB-lac plasmids are derivatives of the broad host range promoter-probe vector pPROBE'-GFP[LVA][20] utilizing different fluorescent reporter genes controlled by the strong *lac* promoter $P_{A1/O4/O3}$, which is constitutive in *E. coli* TOP10. In the example provided (Fig 1), GFP, E2-Orange and mCherry exhibit relatively broad and asymmetrical excitation-emission spectral profiles with a significant degree of overlap. In contrast, the fluorescence signal in the synchronous spectra is confined in Gaussian shaped and much narrow peaks, which result in lower spectral overlap between all three FPs. This spectral simplification and bandwidth narrowing also holds for TurboYFP and DsRed-Express2 (as well as for other recent FPs we examined, e.g. mTagBFP2, Clover, E2-Crimson or mCardinal2; data not shown) as indicated by the systematic reduction of full width at half maximum (FWHM) of spectra acquired synchronously compared to emission peaks (Table 2). It is also noteworthy that the peak position, bandwidth and intensity in synchronous spectra depend on the wavelength offset $\Delta\lambda$ (i.e. fixed wavelength interval between excitation and emission monochromators). Therefore, the $\Delta\lambda$ can be tuned in order to amplify signals of interest or to limit interferences. Generally, we observed that fluorescence maxima shifted to shorter wavelengths with increasing $\Delta\lambda$, and sharper and narrow peaks were obtained for $\Delta\lambda$ ranging from 15 to 30 nm. For the rest of this work, we chose a $\Delta\lambda = 20$ nm which corresponds roughly to the mean Stokes shift (i.e. the difference between absorption and emission maxima) of the studied fluorescent proteins (Table 2).

Synchronous scans of *E. coli* cultures expressing different FPs were performed at this offset and with a fixed signal gain to compare their brightness *in vivo*. The best performances were observed for TurboYFP, which was approximately 1.6-fold brighter than GFP, while mCherry was the dimmest FP with only one eighth the brightness of GFP. It is worth mentioning here that the measured *in vivo* fluorescence levels were strongly correlated ($R^2 = 0.95$) with the *in vitro* FP brightness (Table 2), suggesting that, for the conditions tested, other factors such as mRNA stability or translation efficiency do not significantly affect FP expression. This observation also indicates that SFS may provide a simple way of estimating the relative *in vivo* brightness of FPs from different spectral classes, which is difficult to achieve through traditional spectroscopic or microscopic measurement [5].

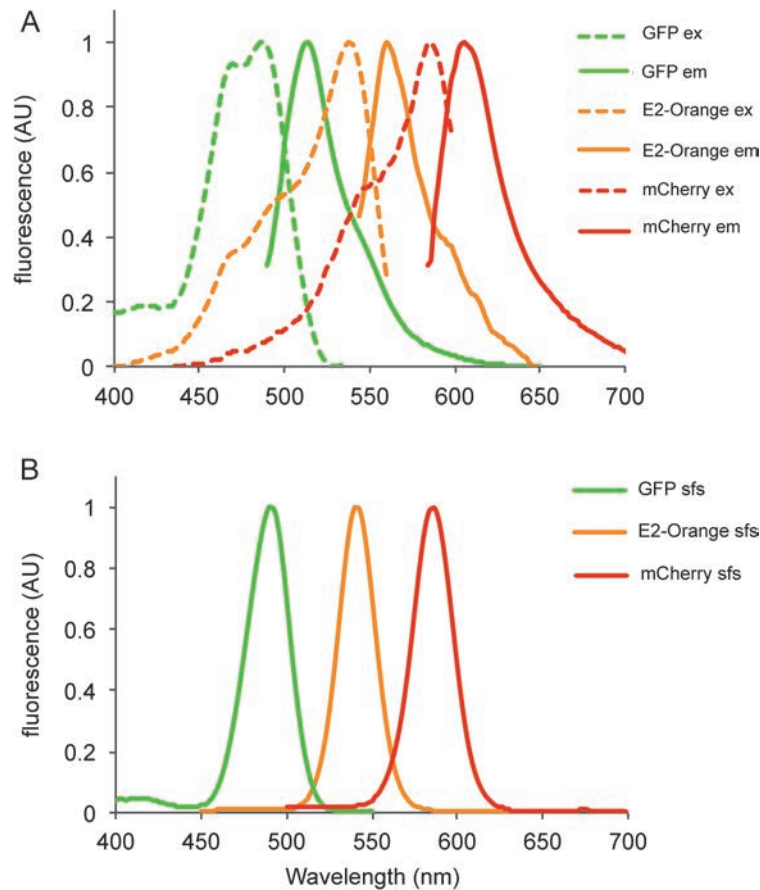


Fig 1. Fluorescence spectra of GFP, E2-Orange and mCherry. Shown are normalized excitation and emission (A) and synchronous (B) fluorescence spectra of *E. coli* cultures expressing GFP, E2-Orange and mCherry.

doi:10.1371/journal.pone.0122848.g001

Table 2. Properties of fluorescent proteins *in vitro* and in living *E. coli* cells.

Protein	λ_{ex}^a	λ_{em}^a	QY ^b	Bright-ness ^b	Matu-ration ^c	λ_{SFS}^d	FWHM SFS ^e	FWHM em. ^f	SFS peak height ^g	Reference ^h
GFP	488	507	0.60	34	0.3	490	28	31	80	[25]
TurboYFP	525	538	0.53	56	ND	519	22	33	130	Evrogen
E2-Orange	540	561	0.54	20	1.3	540	24	39	40	[22]
DsRed-Express2	554	591	0.42	15	0.7	558	27	48	35	[26]
mCherry	587	610	0.22	16	0.7	584	29	44	11	[27]

^a λ_{ex} and λ_{em} are the excitation and emission maxima in nm, respectively

^b QY is the quantum yield; brightness is the product of QY and extinction coefficient (not provided).

^c Time in hour for fluorescence to reach half-maximal value after exposure to oxygen

^d Maxima of synchronous fluorescent spectra at a constant offset value $\Delta\lambda = 20$ nm

^e Full-Width Half-Maximum of synchronous fluorescent spectra acquired at $\Delta\lambda = 20$ nm

^f FWHM of emission spectra at absorption maxima

^g Fluorescence peak intensity for synchronous scan performed at $\Delta\lambda = 20$ nm, expressed as relative fluorescence units normalized to cell density. The photomultiplier detector operated at a voltage of 650V.

Fluorescence data for ^d, ^e, ^f and ^g were obtained from cultures of *E. coli* TOP10 expressing FP constitutively.

^h Source of data for ^a, ^b and ^c.

doi:10.1371/journal.pone.0122848.t002

Coupling synchronous fluorescence spectroscopy to Candecomp/Parafac decomposition method

The substantial bandwidth narrowing obtained by SFS suggested it could facilitate the extraction of individual signals in complex fluorescent mixtures. We therefore constructed such complex fluorescence signals by mixing four different TOP10 *E. coli* strains expressing FPs (GFP, TurboYFP, E2-Orange or DsRed-Express2) constitutively, and simulated variation of FP expression using different strain ratios and strain concentrations (see [material and methods](#) for detailed dilution protocol). Next, we applied the SFS procedure to each mixture and tested the ability of Candecomp/Parafac (CP) algorithm to extract the contribution of individual FPs. Altogether, the trilinear dataset of four overlapping fluorescence signals could be decomposed and compared to benchmark experiments involving single labeled strains treated in the same conditions, as depicted in [Fig 2](#). Before CP decomposition, the fluorescence dataset appeared as

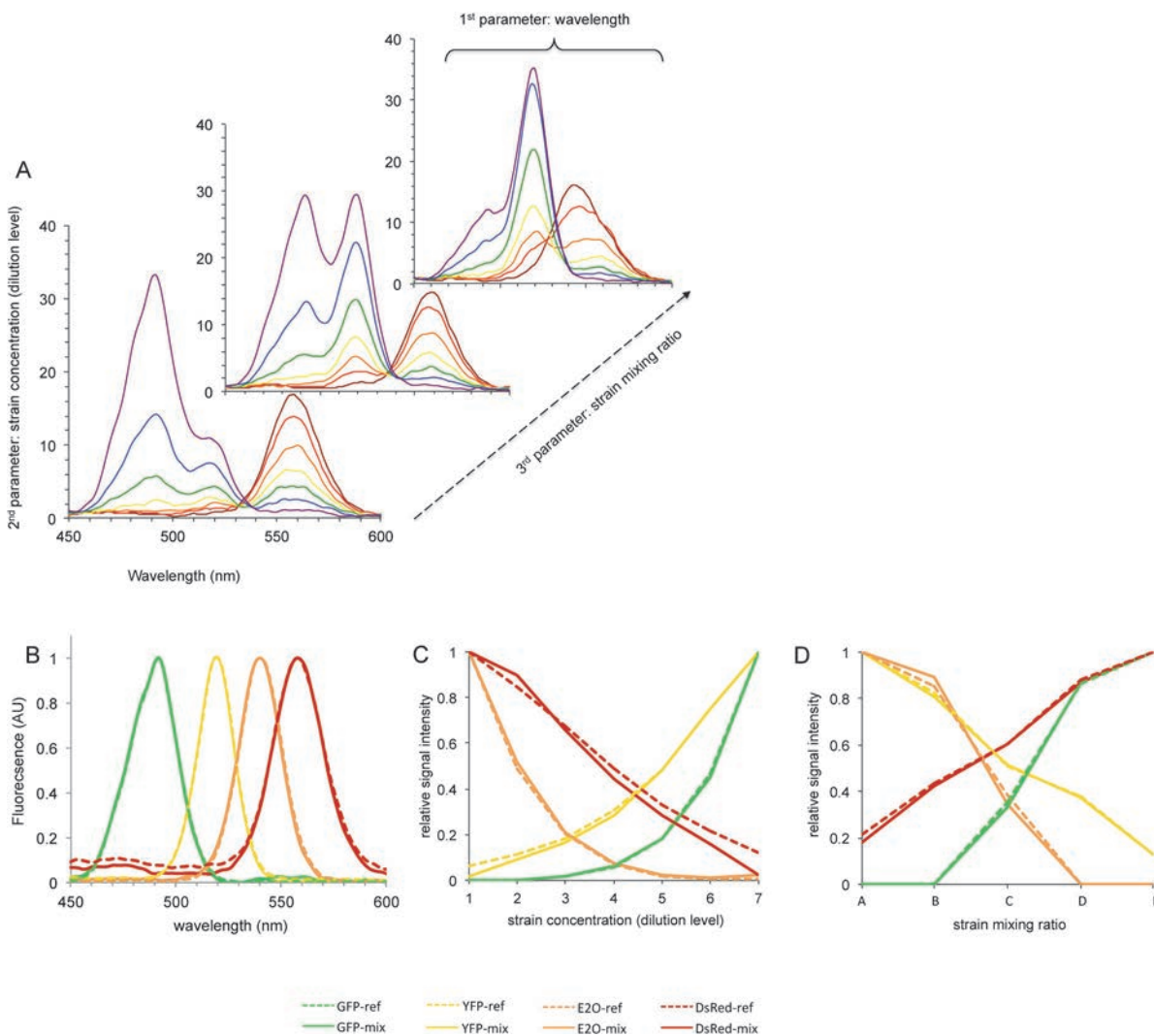


Fig 2. Synchronous spectra acquisition and CP decomposition of fluorescence from mixtures of four *E. coli* TOP10 strains expressing different FPs constitutively. (A) Typical SFS dataset of FP labeled strains mixtures (excerpt of 11 spectra out of 35). (B-D) Outcomes of CP decomposition. The fluorescence profiles estimated from CP analysis of mixtures of FP labeled strains (solid lines) are compared to those obtained from single labeled strains benchmarks (dashed lines). (B) Fluorescence profile as a function of labeled strain concentration (dilution level). (C) Synchronous fluorescent spectra. (D) Fluorescence profile as a function of strains mixing ratio. The mixture pattern for this experiment is presented in [S1 Fig](#). YFP: TurboYFP; E2O: E2-Orange; DsRed: DsRed-express2.

doi:10.1371/journal.pone.0122848.g002

a pool of 35 SFS multi-peak records (Fig 2A). The CP blind decomposition clearly shows that (i) the four fluorescence sources in the mixture could be reliably identified, as judged by the estimated spectra that nearly superimposed with those of the four FPs tested individually (Fig 2B), and (ii) the estimated sources of fluorescence in the mixture behave almost exactly as did fluorescence from individual FP reporter strains with the same level of dilution and relative concentration (Fig 2C and 2D, respectively). These results show that the coupled SFS/CP approach could solve the issue of FP bleed-through in multicolor labeling experiments, even in scenarios involving high spectral overlapping FPs such as E2-Orange and DsRed-Express2, whose synchronous fluorescence peaks are separated by only 18 nm (Table 2).

Application of the joint SFS/CP approach to study iron homeostasis in *P. aeruginosa*

Having demonstrated the proof of principle of SFS/CP on artificial mixtures of labeled bacteria, we tested its usefulness through the monitoring of combined *P. aeruginosa* iron bioreporters. Like most bacteria, *P. aeruginosa* must tightly regulate cellular iron acquisition and storage to prevent the deleterious effects of iron deficiency and iron excess [28]. Under iron restriction condition, *P. aeruginosa* produces two high-affinity iron chelating siderophores named pyoverdine and pyochelin that serve to deliver iron to the cell. The important background fluorescence noise caused by these siderophores prompted us to assess the relevance of our SFS/CP methodology. We then investigated the behavior of the *pvdA* and *bfrB* genes, two iron responsive genes from *P. aeruginosa* that display opposite iron-dependent transcriptional regulation. The *pvdA* gene encoding a L-Ornithine N⁵-oxygenase involved in an early step of the pyoverdine synthesis is repressed by iron. In contrast, the expression of the bacterioferritin encoding gene *bfrB* is induced under iron replete condition. Two *bfrB-e2-orange* and *pvdA-dsred-express2* gene fusions were constructed in pPB plasmids and introduced into *P. aeruginosa* PAO1. The resulting iron bioreporter strains were mixed in defined ratios and grown in the presence of different iron concentrations before SFS acquisition. From CP decomposition of the spectral data, four fluorescent sources could be identified: two of them unambiguously corresponded to E2-Orange and DsRed-Express2, the two others peaked at 416 nm and 450 nm (Fig 3A). The contribution of E2-Orange to the overall fluorescence increased with iron concentration, whereas the DsRed-Express2 signal increased upon iron depletion (Fig 3B), which is well in line with previously described expression of *pvdA* and *bfrB* genes from PAO1 [29], [30]. However, the iron-dependent induction profile of *bfrB-e2-orange* showed a modest yet reproducible decrease around 25 μ M FeCl₃. This particular behavior may reflect subtle regulation of bacterioferritin gene expression that would deserve further investigations. The two other fluorescence sources behave similarly as the expression profile of *pvdA-dsred-express2* with respect to iron concentration (Fig 3B) and were almost unaffected by variation of the bioreporter strains ratios (Fig 3C), suggesting they could correspond to one or two of the siderophores pyoverdine or pyochelin. A SFS control experiment carried out on strain *P. aeruginosa* PAO1 Δ *pvdA* lacking pyoverdine revealed the complete disappearance of the two signals, thus ruling out the possible contribution of pyochelin (Fig 3A and 3D). Interestingly, the supernatant of PAO1 WT cultures showed a SFS peak that shifted from 416 nm at acidic pH to 450 nm at pH 10 (Fig 3E). In contrast, synchronous spectra of purified pyoverdine exhibited a single band at 416 nm peak whatever the pH. These data strongly suggest that both sources actually correspond to two fluorescent forms of pyoverdine (PVD) we designated af-PVD (“acidic form”, 416-nm peak) and bf-PVD (“basic form”, 450 nm peak). While af-PVD most probably corresponds to iron-free pyoverdine, the nature of bf-PVD is still uncertain. Romanowski et al. [31] also observed a major fluorescent peak at around 490 nm in addition to the characteristic

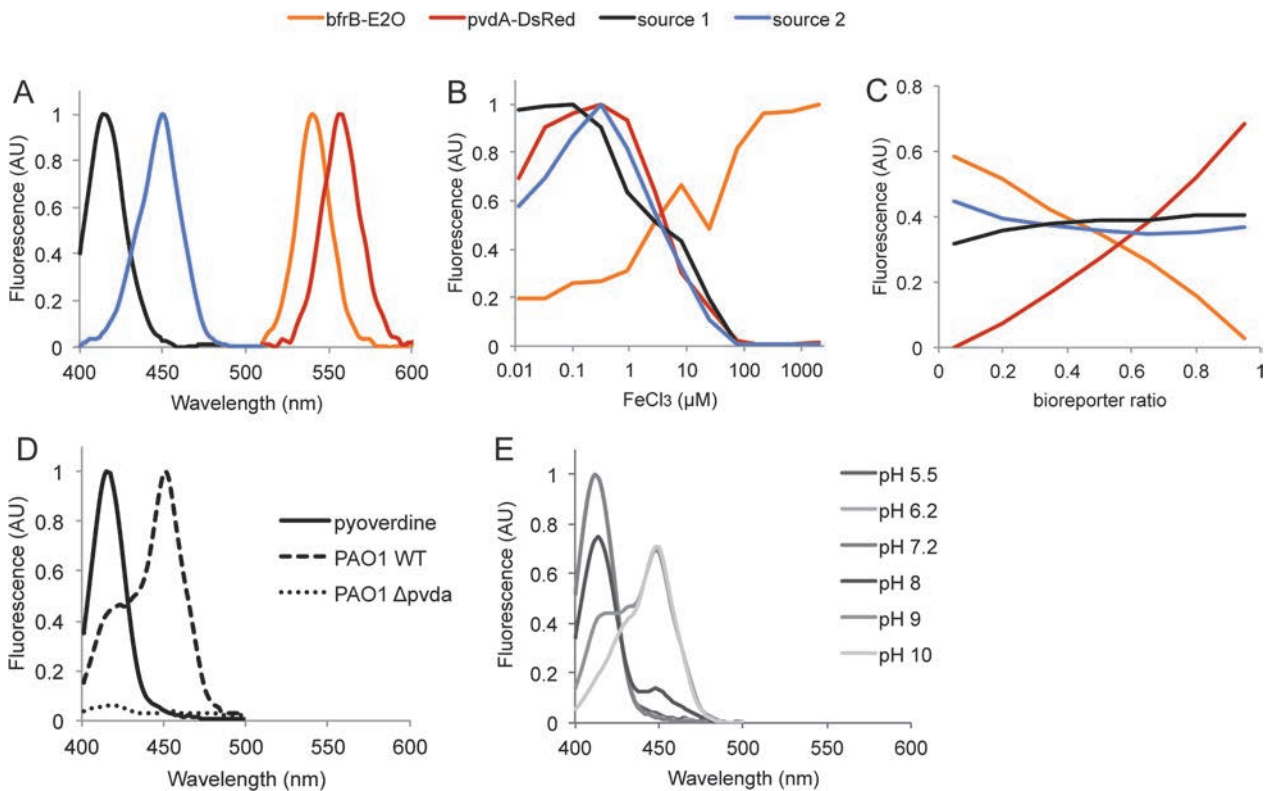


Fig 3. Spectral decomposition of fluorescence from mixtures of two *P. aeruginosa* PAO1 iron bioreporter strains harboring *pvdA-dsred-express2* and *bfrB-e2-orange* fusions. Shown are (A) the spectra of the four fluorescent sources identified from CP analysis and their profile as a function of (B) iron concentration and (C) the ratio of bioreporter strains in the mixture. The mixture pattern for this experiment is presented in S2 Fig. (D) Synchronous spectra of purified pyoverdine (solid line) and cultures of PAO1 wild type (WT, dashed line) and PAO1 $\Delta pvdA$ (large dashed lines) cells grown in low-iron DCAA medium. The later spectrum was normalized with respect to that obtained for PAO1 wild type. (E) Synchronous spectra of WT PAO1 culture supernatant as a function of pH. The DCAA growth medium supernatant was diluted tenfold in different buffers with pH adjusted to 5.2 and 6.2 (40 mM MES), 7.4 (40 mM MOPS) and 8, 9 and 10 (40 mM Tris-HCl).

doi:10.1371/journal.pone.0122848.g003

emission band of pyoverdine in phosphate-limited cultures of PAO1, however its origin was not investigated. A possible explanation for this fluorescent signal would be the particular pH-dependent biotic or abiotic interactions that pyoverdine can have with components of the local microenvironment [32].

The SFS/CP approach used here enabled to monitor reliably and simultaneously the expression of the *bfrB* and *pvdA* genes along with pyoverdine production, thus proving again its ability to integrate multiple signals from combinations of fluorescent whole cell bioreporters.

Testing the limits of the SFS/CP approach

Blind CP decomposition of multispectral data is constrained by the level of linear dependencies of mixed fluorescent sources with respect to the tested variables. In case of reduced collinearity, i.e. when the different sources evolve almost independently, as for *pvdA* and *bfrB* that show opposite iron-dependent transcription response, the solution provided by CP decomposition is unique. In case of higher level of collinearity, similar response profiles may lead to incomplete separation by the CP algorithm. In order to test this situation, we repeated the above experiment with an additional *pvdS-gfp* fluorescent construct. The *pvdS* gene encodes an alternative sigma factor that is required for the production of pyoverdine [33]. Like *pvdA*, the expression of *pvdS* is regulated by the ferric uptake regulator (Fur) and is optimal under iron limiting

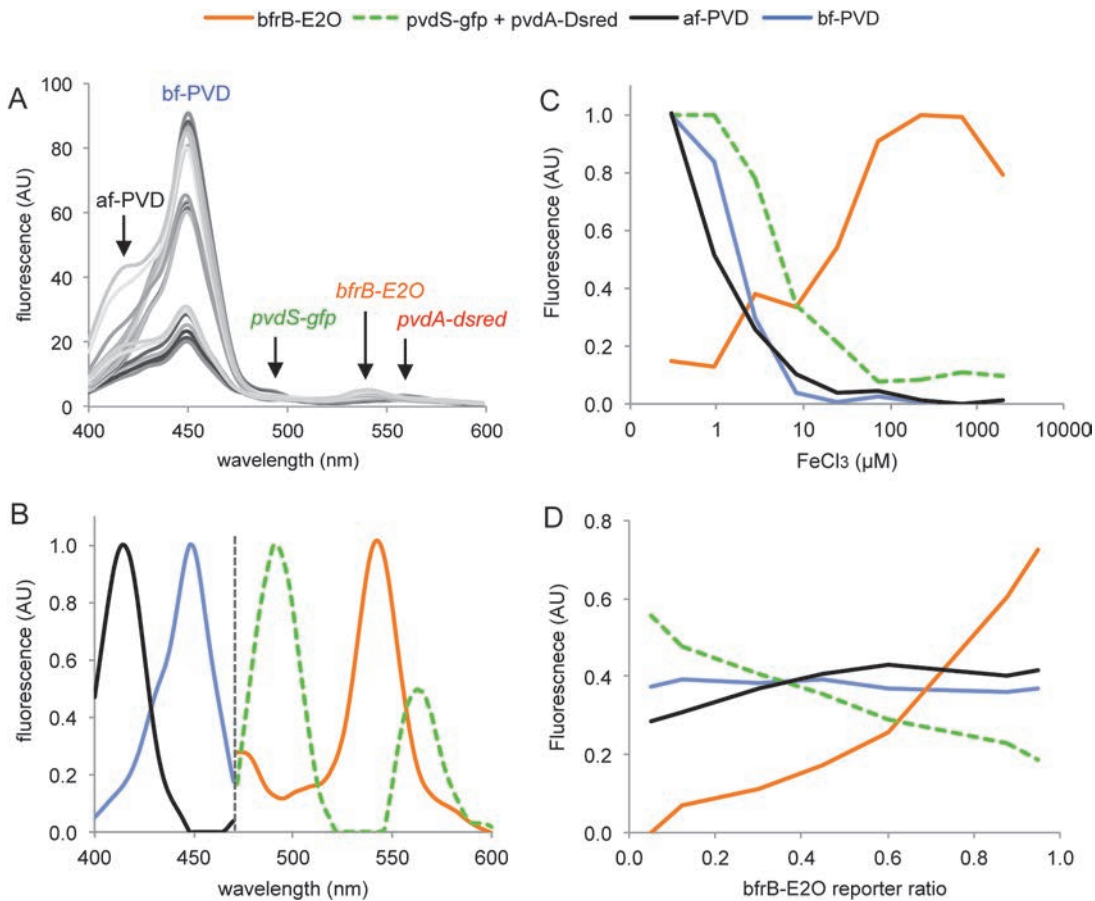


Fig 4. Spectral decomposition of fluorescence from mixtures of three *P. aeruginosa* PAO1 iron bioreporter strains harboring *pvdS-gfp*, *pvdA-dsred-express2* and *bfrB-e2-orange* fusions. (A) Raw synchronous spectra of strain mixtures incubated with 0.3, 1 and 3 1/4 M FeCl₃ showing the relative intensity of fluorescent signals. (B) Spectra of the four fluorescent sources identified from CP analysis performed independently on 400–470 nm and 470–600 nm wavelength ranges. (C) Profile of fluorescence sources as a function of iron concentration. (D) Profile of fluorescence sources as a function of the ratio of *bfrB-e2-orange* reporter strain in the mixture. The mixture pattern for this experiment is presented in S3 Fig. PVD: pyoverdine; af-PVD and bf-PVD: “acid” and “basic” forms of pyoverdine.

doi:10.1371/journal.pone.0122848.g004

conditions. For the sake of demonstration, cells harboring the *pvdS-gfp* and *pvdA-dsred-express2* constructs were intentionally kept in similar proportions to increase collinearity when mixed with the *bfrB-E2-orange* reporter. Mixtures of the three iron bioreporter strains incubated with different iron concentrations were analyzed by synchronous spectroscopy. A rapid examination of raw spectra shows that they are dominated by the pyoverdine signal at low iron concentration (Fig 4A). The signal intensity from *pvdS-gfp* (shoulder peak at 490 nm) and *pvdA-dsred-express2* (peak at 558 nm) did not exceed ca. 10% that of bf-PVD. Owing to this, CP analysis of the whole data set could not separate properly the three collinear sources, which were combined in a single composite spectrum after decomposition (not shown). We therefore performed CP decomposition on spectral data from 470 nm to 600 nm in order to exclude most of the pyoverdine fluorescence from the analysis and avoid biases related to their intense signals. This procedure enabled the separation of the GFP signal from bf-PVD, but not from DsRed-express2 (Fig 4B). As expected, both the green and red signals were estimated as a single source due to high degree of collinearity. Nevertheless, they displayed a typical iron response profile (Fig 4C), close to that obtained with *pvdA* in the previous experiment. The E2-Orange signal due to *bfrB* expression was identified as well, and showed the expected iron-dependent

induction profile, with however a less marked decrease occurring around 10^{-4} M FeCl_3 . Finally, CP decomposition of spectral data from 400 to 470 nm enabled the identification of the two forms of pyoverdine.

Results from this experiment indicate that proper CP decomposition of multiple fluorescence sources can be affected both by their level of collinearity and their intensity. Incomplete separation of sources from fluorescent reporters, as observed with *pvdS* and *pvdA*, is not a problem per se. Rather it indicates that genes follow the same expression pattern. In contrast, low intensity signals may not be discriminated from disproportionately high ones, or even unidentified when too close to the background noise level. Indeed, attempts to include a fourth PAO1 strain expressing mCherry constitutively in the above mixtures led to a further dilution of the fluorescent signals produced by the reporters and the lowest one (DsRed-Express2) could not be properly identified (not shown).

Conclusions

This work introduces a spectroscopic approach for multiplex fluorescent bacterial biosensing. We show that synchronous fluorescence spectroscopy offers a simple and efficient means not only of narrowing and simplifying spectra of FPs, but also of recording signals from FP mixtures in a single scan. Application of the popular Candecomp-Parafac decomposition tool to synchronous spectral array data obtained from artificial mixtures of FP labeled *E. coli* strains led to successful blind identification of each FP component. The method proved to be sufficiently sensitive for the analysis of three *P. aeruginosa* iron bioreporters mixtures with low fluorescence output. Moreover, it revealed subtle yet unexpected iron-dependent bacterioferritin gene expression and enabled concomitant detection of pyoverdine and a related fluorescent signals that would not have been detected otherwise.

Our method is implemented in standard microplates, a convenient 2D format to examine the simultaneous influence of two variables on the expression of several fluorescent reporters and to generate three-way (variable 1 x variable 2 x wavelength) spectral data that can be analyzed with CP. It should be noted that time can be used as a variable in this system, thereby enabling the temporal dynamics of multiple reporter gene expression to be monitored as well. Applications that can be envisioned include, for instance, characterizing the behavior of natural and synthetic genetic networks [34], [35], monitoring the activity of different fluorescent labeled bacteria in complex environmental samples [36] or the detection of multiple pollutants in a same sample [37]. Furthermore, the approach is not restricted to the analysis of genetically encoded fluorescent signals and could be expanded, as demonstrated here with the detection of pyoverdine, to any compound that emits a quantifiable fluorescence such as organic dyes or quantum dots. Although the method provides a qualitative determination of mixed fluorescents signals at the moment, the expansion to quantitative analysis is achievable and currently under development using the standard addition method or through incorporation of an internal fluorescent standard.

Supporting Information

S1 Fig. Microplate dispensing pattern of FP labeled *E. coli* strains. Seven serially diluted cell suspensions of *E. coli* TOP10 producing GFP, TurboYFP (YFP), E2-Orange (E2O) and DsRed-Express2 (DsRx) were mixed in five different ratios to simulate variation of FP expression. The untransformed TOP10 strain was used as a diluent to maintain a constant cell concentration (i.e. $2 \cdot 10^8$ cells/well) in the wells. The number of each fluorescent bacteria per well is given. Color-graded triangles represent the dilution level of each fluorescent strain from column 1 to 7 as well as from line A to E.
(TIF)

S2 Fig. Microplate dispensing pattern of two iron responsive bioreporter strains. Cell suspensions of PAO1/pPB-bfrB-O561 and PAO1/pPB-pvdA-R591 (approx. 4.10^7 cells/ml) were mixed in seven different ratios (95:5; 85:15; 75:25; 50:50; 25:75; 15:85 and 5:95 from lane A to G) and supplemented with indicated concentrations of FeCl_3 from column 1 to 12. (TIF)

S3 Fig. Microplate dispensing pattern of three iron responsive bioreporter strains. Cell suspensions of PAO1/pPROBE-NT⁺-pvdS, PAO1/pPB-bfrB-O561 and PAO1/pPB-pvdA-R591 (approx. 4.10^7 cells/ml) were mixed in seven different ratios (47.5:47.5:5; 47.5:40:12.5; 40:30:30; 30:25:45; 20:20:60; 5:10:85 and 2.5:2.5:95 from lane A to G) and supplemented with indicated concentrations of FeCl_3 from column 1 to 9. (TIF)

S1 Text. Methods for vector construction.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Ehud Banin for the kind gift of *P. aeruginosa* strains and Ole Nybroe for providing pJBA28, Benjamin Glick and Robert Keenan for making fluorescent proteins publicly available through Addgene, and Christophe Merlin for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CM PB DP. Performed the experiments: DP PB. Analyzed the data: DP CM PB. Contributed reagents/materials/analysis tools: DB SM. Wrote the paper: PB.

References

1. Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol Rev.* 2010; 90: 1103–1163. doi: [10.1152/physrev.00038.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009) PMID: [20664080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20664080/)
2. Larrainzar E, O’Gara F, Morrissey JP. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Annu Rev Microbiol.* 2005; 59: 257–277. doi: [10.1146/annurev.micro.59.030804.121350](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121350) PMID: [16153170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16153170/)
3. Ghim C-M, Lee SK, Takayama S, Mitchell RJ. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep.* 2010; 43: 451–460. PMID: [20663405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20663405/)
4. Van der Meer JR, Belkin S. Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 511–522. doi: [10.1038/nrmicro2392](https://doi.org/10.1038/nrmicro2392) PMID: [20514043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20514043/)
5. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods.* 2005; 2: 905–909. doi: [10.1038/NMETH819](https://doi.org/10.1038/NMETH819) PMID: [16299475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16299475/)
6. Day RN, Davidson MW. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev.* 2009; 38: 2887–2921. doi: [10.1039/b901966a](https://doi.org/10.1039/b901966a) PMID: [19771335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19771335/)
7. Zimmermann T. Spectral Imaging and Linear Unmixing in Light Microscopy. In: Rietdorf J, editor. *Microscopy Techniques.* Springer Berlin Heidelberg; 2005. pp. 245–265. Available: <http://dx.doi.org/10.1007/b102216>
8. Bansal L, Nelson R, Yang E, Jayaraman A, Hahn J. Experimental design of systems involving multiple fluorescent protein reporters. *Chem Eng Sci.* 2013; 101: 191–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2013.06.021>
9. Neher RA, Mitkovski M, Kirchhoff F, Neher E, Theis FJ, Zeug A. Blind source separation techniques for the decomposition of multiply labeled fluorescence images. *Biophys J.* 2009; 96: 3791–3800. doi: [10.1016/j.bpj.2008.10.068](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.068) PMID: [19413985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19413985/)
10. Harshman RA. Foundations of the PARAFAC procedure: Models and conditions for an “explanatory” multi-modal factor analysis [Internet]. *Ann Arbor: UCLA; 1970* pp. 1–84. Report No.: 16. Available: <http://publish.uwo.ca/harshman/abstract.html>

11. Bro R. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom Intell Lab Syst.* 1997; 38: 149–171. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00032-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00032-4)
12. Sidiropoulos ND, Bro R. On the uniqueness of multilinear decomposition of N-way arrays. *J Chemom.* 2000; 14: 229–239. doi: [10.1002/1099-128X\(200005/06\)14:3<229::AID-CEM587>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1099-128X(200005/06)14:3<229::AID-CEM587>3.0.CO;2-N)
13. Miron S, Dossot M, Carteret C, Margueron S, Brie D. Joint processing of the parallel and crossed polarized Raman spectra and uniqueness in blind nonnegative source separation. *Chemom Intell Lab Syst.* 2011; 105: 7–18. doi: [10.1016/j.chemolab.2010.10.005](https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.10.005)
14. Guo X, Miron S, Brie D, Stegeman A. Uni-mode and Partial Uniqueness Conditions for CANDECOMP/PARAFAC of Three-Way Arrays with Linearly Dependent Loadings. *SIAM J Matrix Anal Appl.* 2012; 33: 111–129. doi: [10.1137/110825765](https://doi.org/10.1137/110825765)
15. Shirakawa H, Miyazaki S. Blind spectral decomposition of single-cell fluorescence by parallel factor analysis. *Biophys J.* 2004; 86: 1739–1752. doi: [10.1016/S0006-3495\(04\)74242-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74242-3) PMID: [14990501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14990501/)
16. Lloyd J. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra. *Nature.* 1971; 231: 64–65.
17. Patra D, Mishra AK. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *TrAC Trends Anal Chem.* 2002; 21: 787–798. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)01201-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(02)01201-3)
18. Visca P, Colotti G, Serino L, Verzili D, Orsi N, Chiancone E. Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 2886–2893. PMID: [1444402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1444402/)
19. Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, Vasil ML. GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol.* 2002; 45: 1277–1287. PMID: [12207696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12207696/)
20. Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000; 13: 1243–1250. doi: [10.1094/MPMI.2000.13.11.1243](https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1243) PMID: [11059491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11059491/)
21. Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 2240–2246. PMID: [9603842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9603842/)
22. Strack RL, Bhattacharyya D, Glick BS, Keenan RJ. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *Bmc Biotechnol.* 2009; 9: 32. doi: [10.1186/1472-6750-9-32](https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-32) PMID: [19344508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19344508/)
23. Lutz R, Bujard H. Independent and Tight Regulation of Transcriptional Units in *Escherichia Coli* Via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 Regulatory Elements. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 1203–1210. doi: [10.1093/nar/25.6.1203](https://doi.org/10.1093/nar/25.6.1203) PMID: [9092630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9092630/)
24. Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods.* 2006; 64: 391–397. doi: [10.1016/j.mimet.2005.06.001](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.001) PMID: [15987659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15987659/)
25. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 1996; 173: 33–38. doi: [10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0) PMID: [8707053](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8707053/)
26. Strack RL, Strongin DE, Bhattacharyya D, Tao W, Berman A, Broxmeyer HE, et al. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Methods.* 2008; 5: 955–957. doi: [10.1038/nmeth.1264](https://doi.org/10.1038/nmeth.1264) PMID: [18953349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18953349/)
27. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 2004; 22: 1567–1572. doi: [10.1038/nbt1037](https://doi.org/10.1038/nbt1037) PMID: [15558047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15558047/)
28. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 2003; 27: 215–237. doi: [10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X) PMID: [12829269](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829269/)
29. Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, et al. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 9792–9797. doi: [10.1073/pnas.0403423101](https://doi.org/10.1073/pnas.0403423101) PMID: [15210934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210934/)
30. Tiburzi F, Imperi F, Visca P. Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2008; 67: 213–227. doi: [10.1111/j.1365-2958.2007.06051.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06051.x) PMID: [18047579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18047579/)
31. Romanowski K, Zaborin A, Fernandez H, Poroyko V, Valuckaite V, Gerdes S, et al. Prevention of siderophore-mediated gut-derived sepsis due to *P. aeruginosa* can be achieved without iron provision by maintaining local phosphate abundance: role of pH. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 212. doi: [10.1186/1471-2180-11-212](https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-212) PMID: [21943078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21943078/)

32. Valeur B, Berberan-Santos MN. Structural Effects on Fluorescence Emission. *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012. pp. 75–107. Available: <http://dx.doi.org/10.1002/9783527650002.ch4>
33. Cunliffe HE, Merriman TR, Lamont IL. Cloning and characterization of pvdS, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *J Bacteriol*. 1995; 177: 2744–2750. PMID: [7751284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7751284/)
34. Cox R, Dunlop M, Elowitz M. A synthetic three-color scaffold for monitoring genetic regulation and noise. *J Biol Eng*. 2010; 4: 10. doi: [10.1186/1754-1611-4-10](https://doi.org/10.1186/1754-1611-4-10) PMID: [20646328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20646328/)
35. Ball DA, Lux MW, Graef RR, Peterson MW, Valenti JD, Dileo J, et al. Co-design in synthetic biology: a system-level analysis of the development of an environmental sensing device. *Pac Symp Biocomput Pac Symp Biocomput*. 2010; 385–396.
36. Hewitt BM, Singhal N, Elliot RG, Chen AYH, Kuo JYC, Vanholsbeeck F, et al. Novel Fiber Optic Detection Method for in Situ Analysis of Fluorescently Labeled Biosensor Organisms. *Environ Sci Technol*. 2012; 46: 5414–5421. doi: [10.1021/es300164p](https://doi.org/10.1021/es300164p) PMID: [22502724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22502724/)
37. Jouanneau S, Durand M-J, Courcoux P, Blusseau T, Thouand G. Improvement of the identification of four heavy metals in environmental samples by using predictive decision tree models coupled with a set of five bioluminescent bacteria. *Environ Sci Technol*. 2011; 45: 2925–2931. doi: [10.1021/es1031757](https://doi.org/10.1021/es1031757) PMID: [21355529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21355529/)

Annexe III : Visualisation de l'expression cellulaire des promoteurs *rrnC*, *rpsJ* et *yfhL* chez *E. coli* K12 MG1655 (« single cell approach »)

Biosenseurs : Promoteurs associés à la GFP_Mut2

rrnC::gfp_mut2
rpsJ::gfp_mut2
yfhL::gfp_mut2

Comptage cellulaire réalisé sur plusieurs champs avec un microscope à épifluorescence Nikon 80i, équipé d'une caméra refroidie monochrome DS-QI1MC (Nikon).

La fluorescence de la GFP est mesurée avec une excitation entre 465-490nm et une collection en émission entre 515-555nm

Analyses statistiques morphométriques et d'expression des promoteurs au niveau cellulaire réalisées avec le logiciel Nikon NIS – version Br.

La statistique est établie sur plus de 1400 cellules

Expression stochastique du promoteur *yfhL* chez *E. coli* K12 MG1655

Experiment Date 11/02/2014

Filename : AZ32 D3 yfhL 110214a.jp2

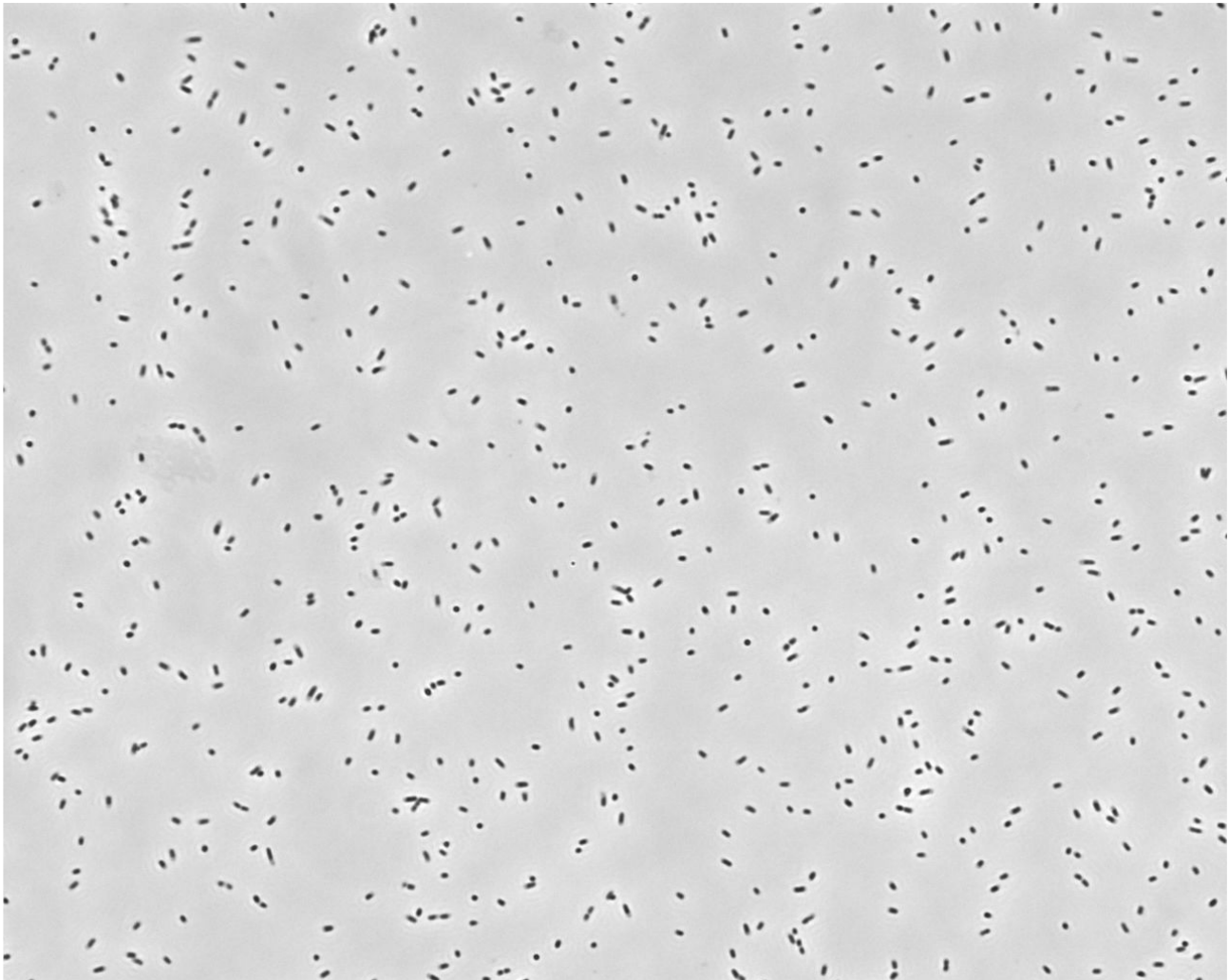
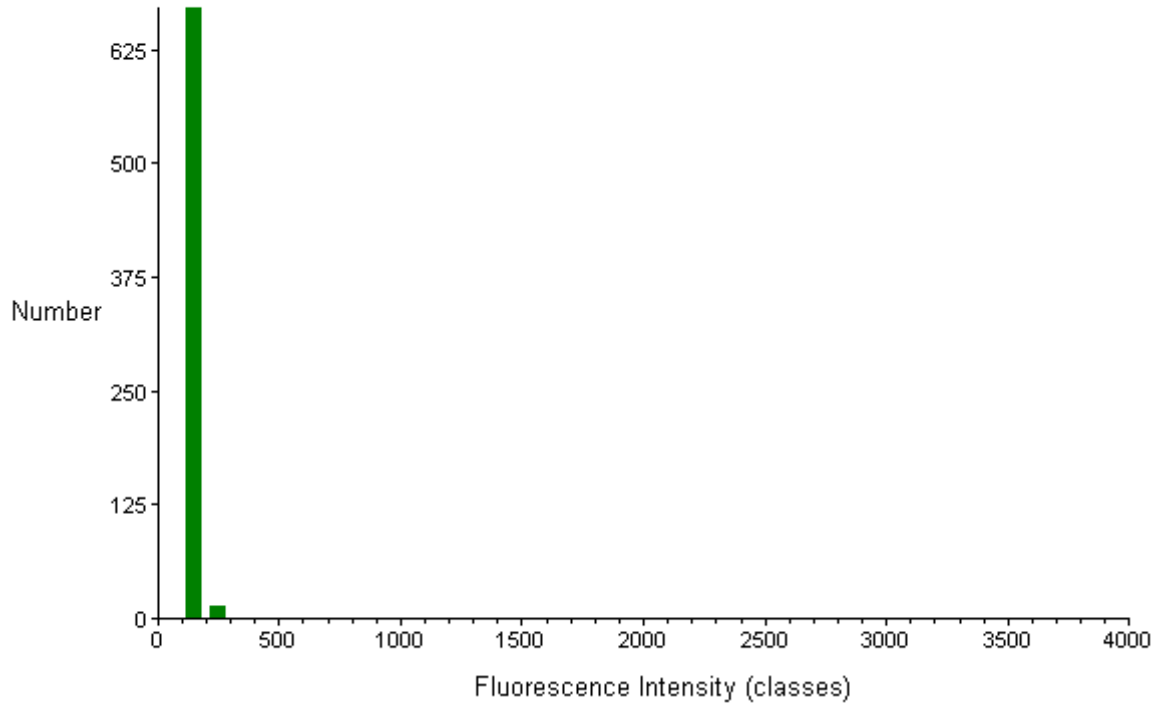


Image size : 1280 x 1024 pixels²
Calibration : 0,16 μm /pixel

Objectif : Plan Fluor 40x Ph2 DLL
Number of cells : 696

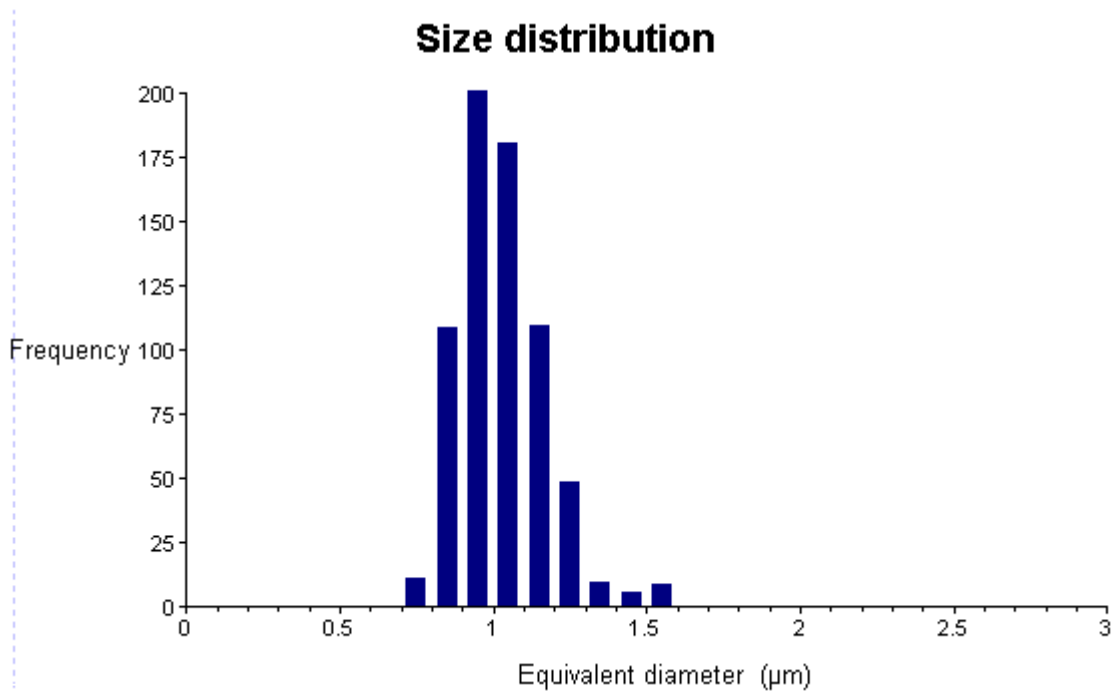
GFP Fluorescence



Mean Fluorescence Intensity : 141,76 RFU
[Ex 465-490nm]/[Em 515-555nm]

SDV Fluorescence Intensity : 28,11

Size distribution



Mean Diameter : 1.03 µm

SDV Diameter : 0.16 µm

Filename : AZ32 D3 yfhL 110214b.jp2

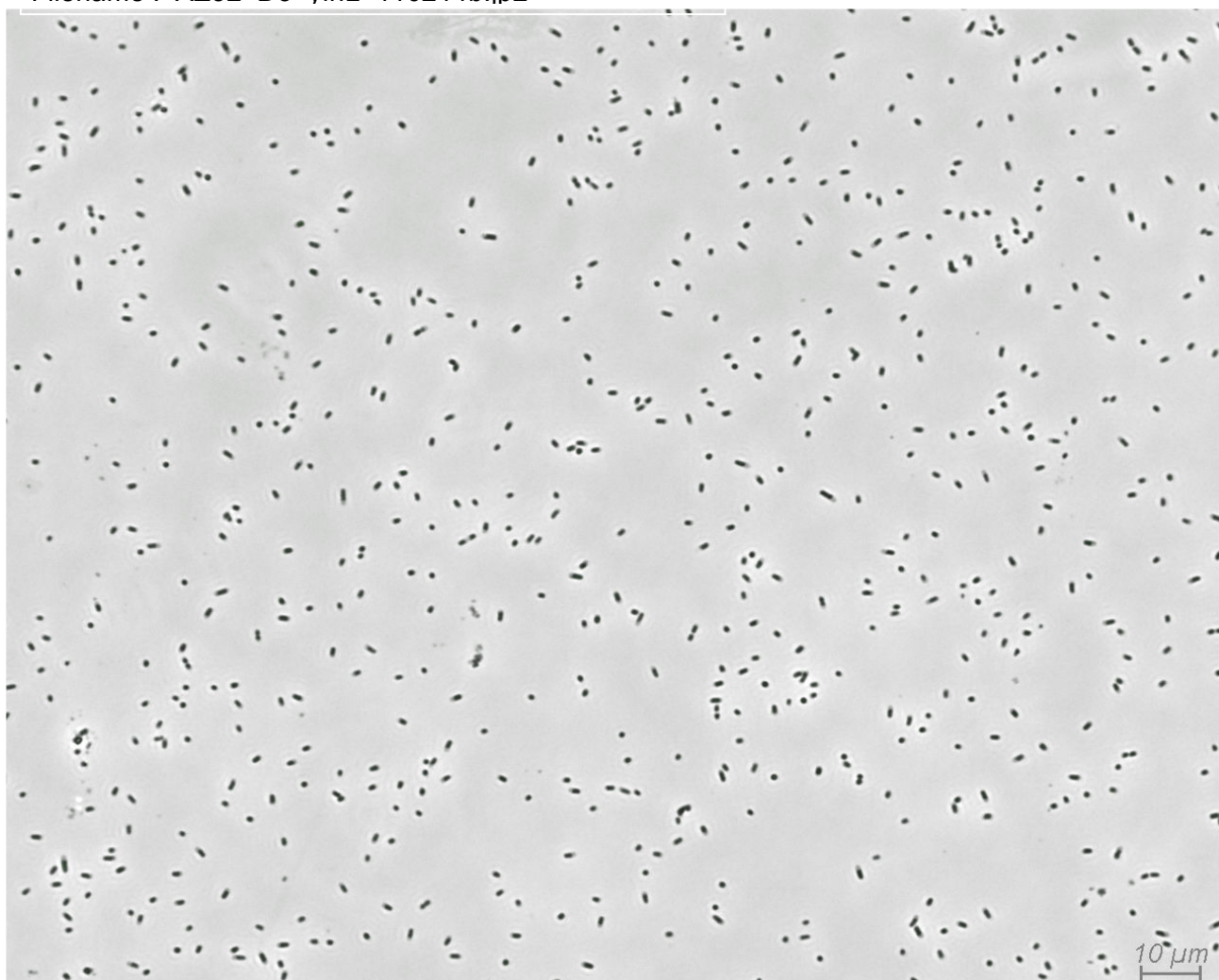
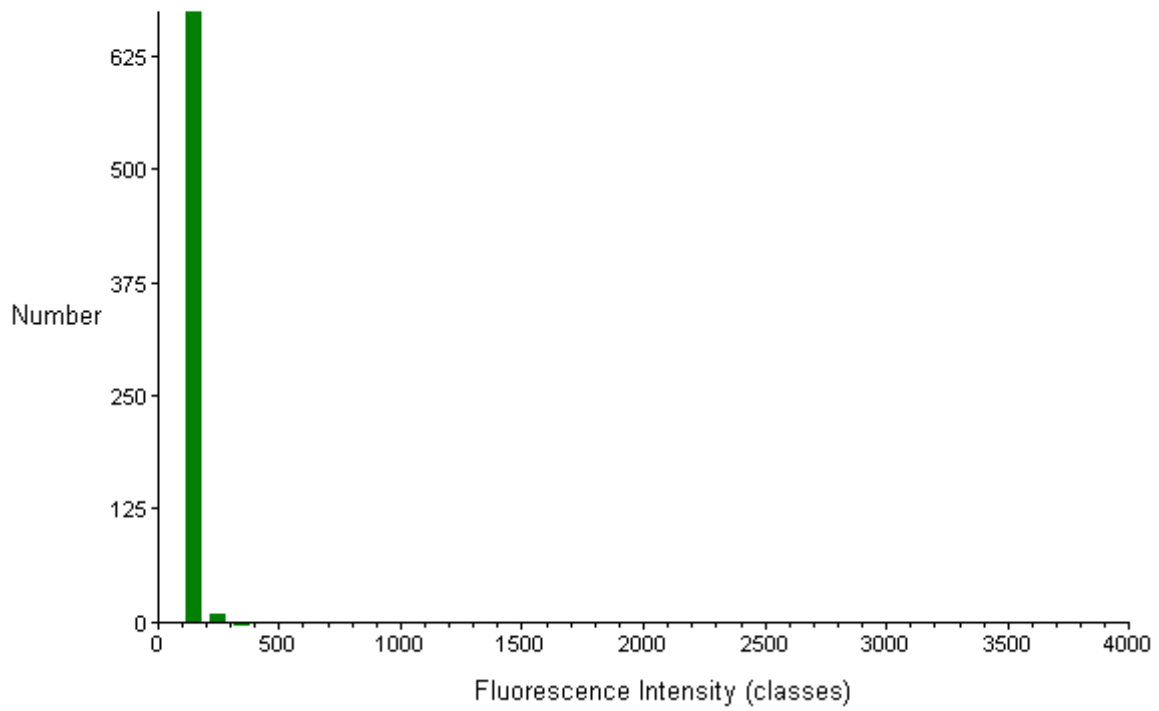


Image size : 1280 x 1024 pixels²
Calibration : 0,16 μm/pixel

Objectif : Plan Fluor 40x Ph2 DLL
Number of cells : 690

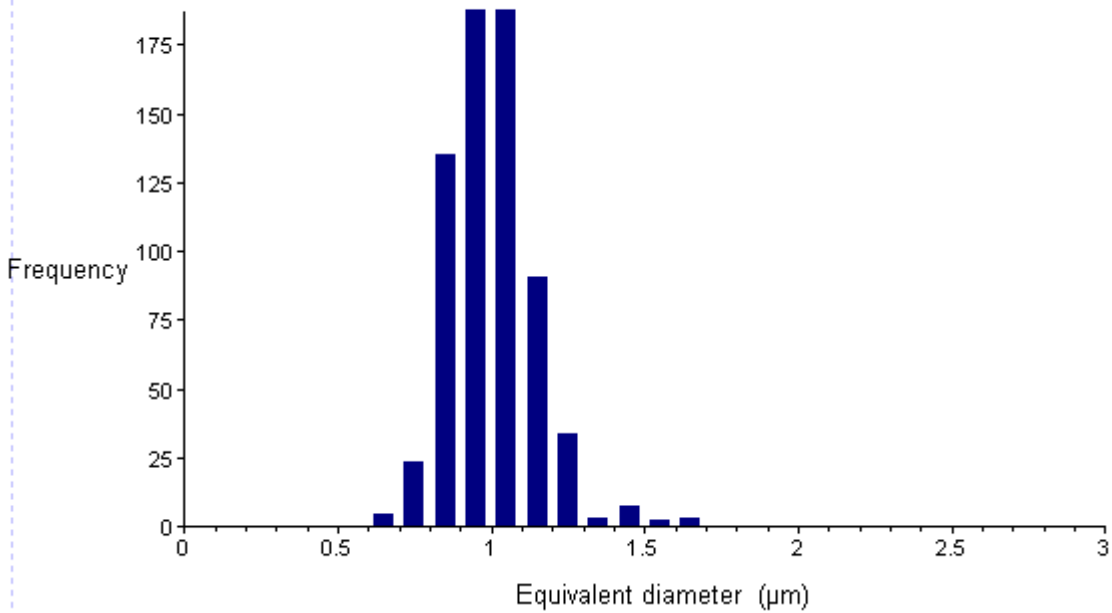
GFP Fluorescence



Mean Fluorescence Intensity : 141,02 RFU
[Ex 465-490nm]/[Em 515-555nm]

SDV Fluorescence Intensity : 26,19

Size distribution



Mean Diameter : 1,01 µm

SDV Diameter : 0,15 µm

Expression stochastique du promoteur *rpsJ* chez *E. coli* K12 MG1655

Experiment Date 11/02/2014

Filename : AZ32 F6 rpsJ 110214a.jp2

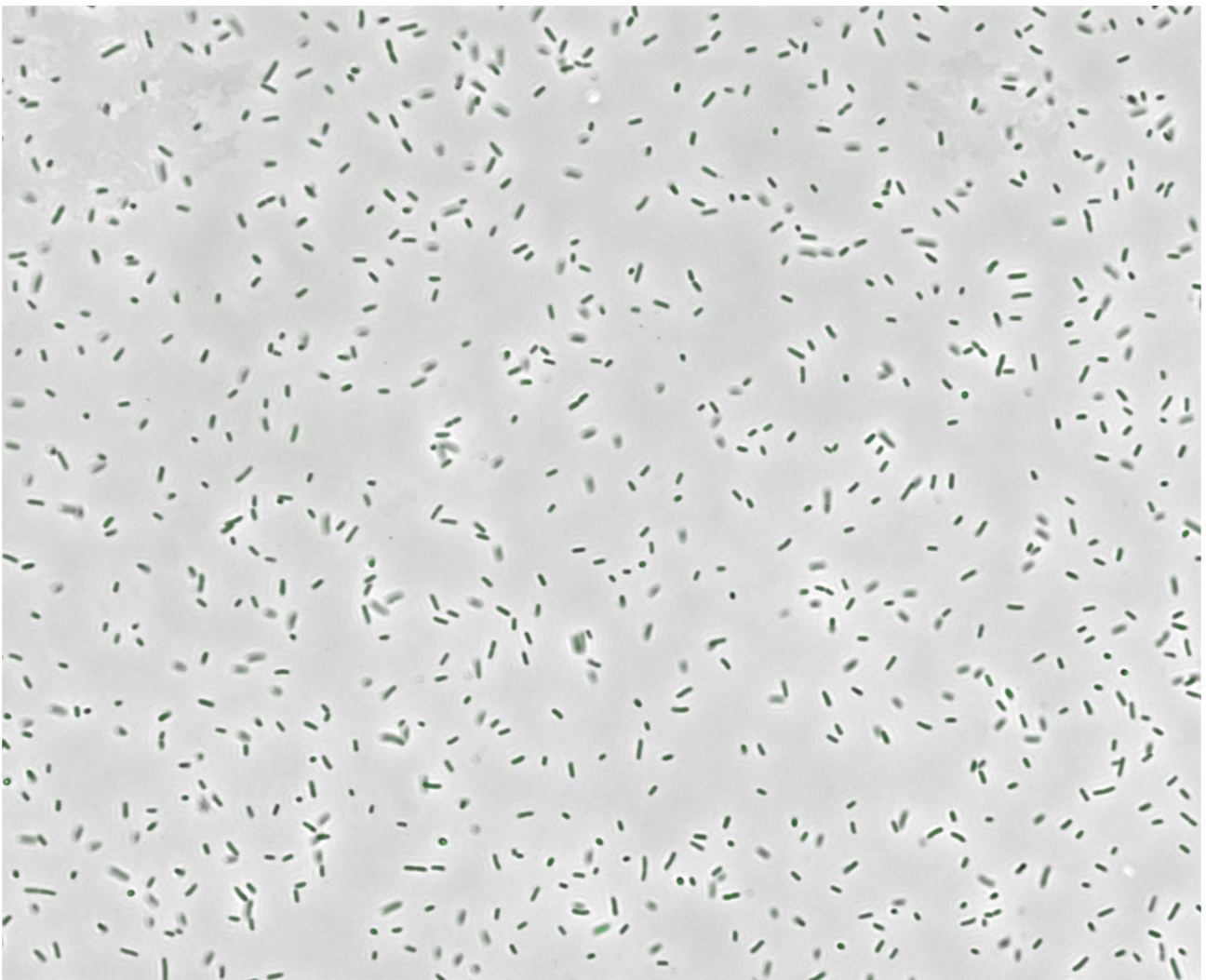


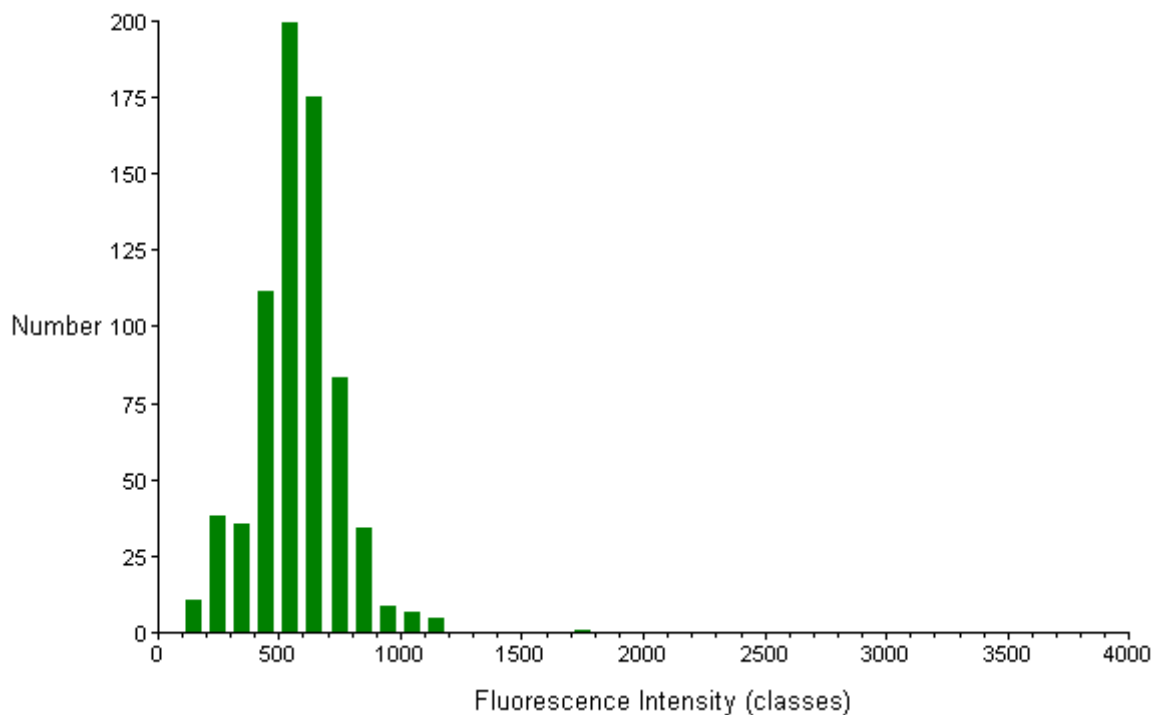
Image size : 1280 x 1024 pixels²

Calibration : 0,16 μm /pixel

Objectif : Plan Fluor 40x Ph2 DLL

Number of cells : 721

GFP Fluorescence

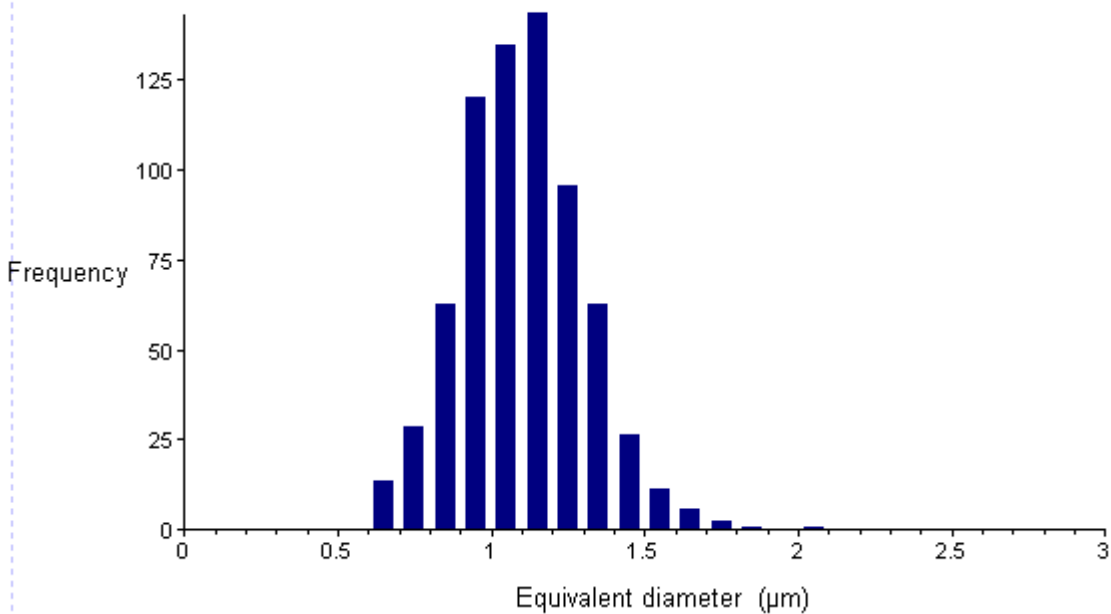


Mean Fluorescence Intensity : 580,24 RFU

SDV Fluorescence Intensity : 172,58

[Ex 465-490nm]/[Em 515-555nm]

Size distribution



Mean Diameter : 1,1 µm

SDV Diameter : 0,2 µm

Filename : AZ32 F6 rpsJ 110214b.jp2

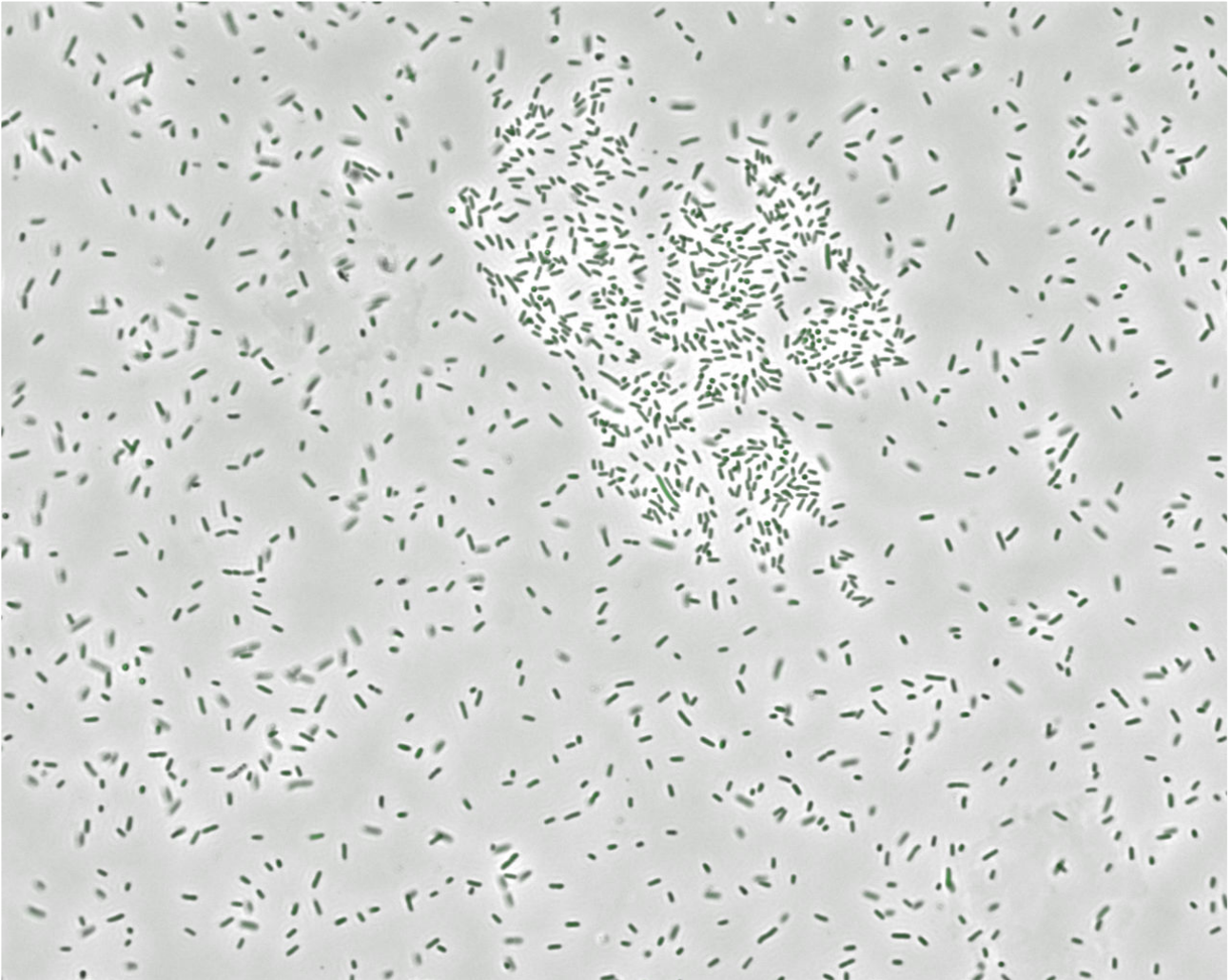


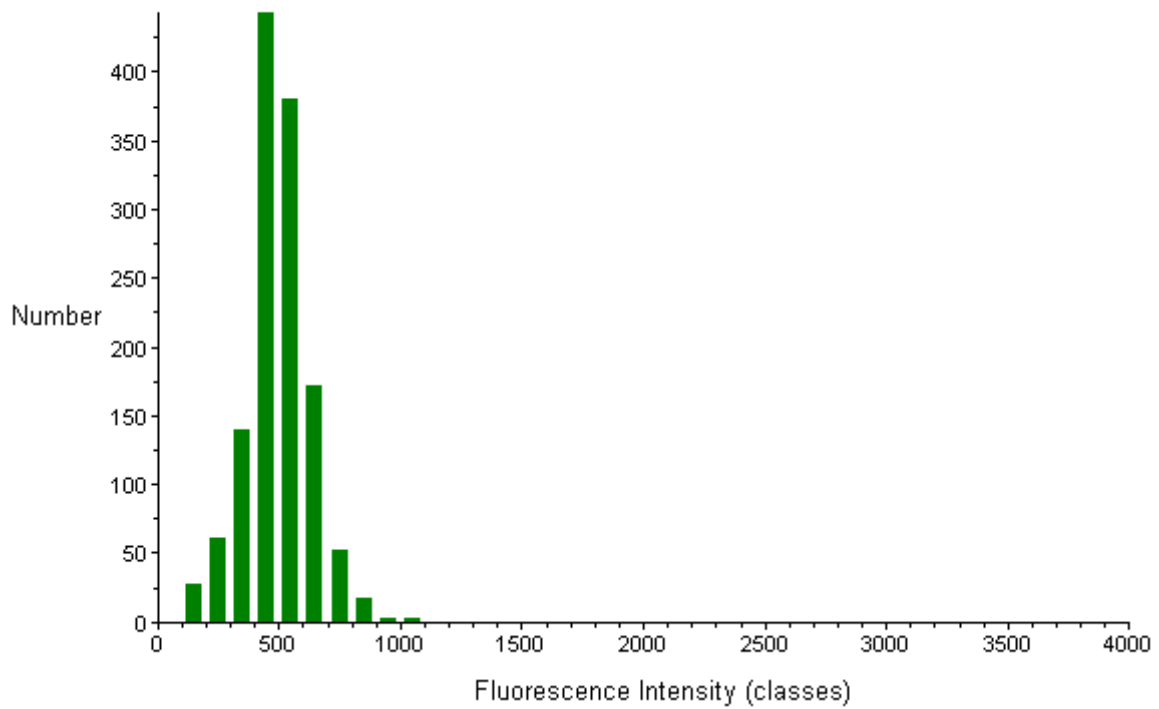
Image size : 1280 x 1024 pixels²

Calibration : 0.16 $\mu\text{m}/\text{pixel}$

Objectif : Plan Fluor 40x Ph2 DLL

Number of cells : 1327

GFP Fluorescence

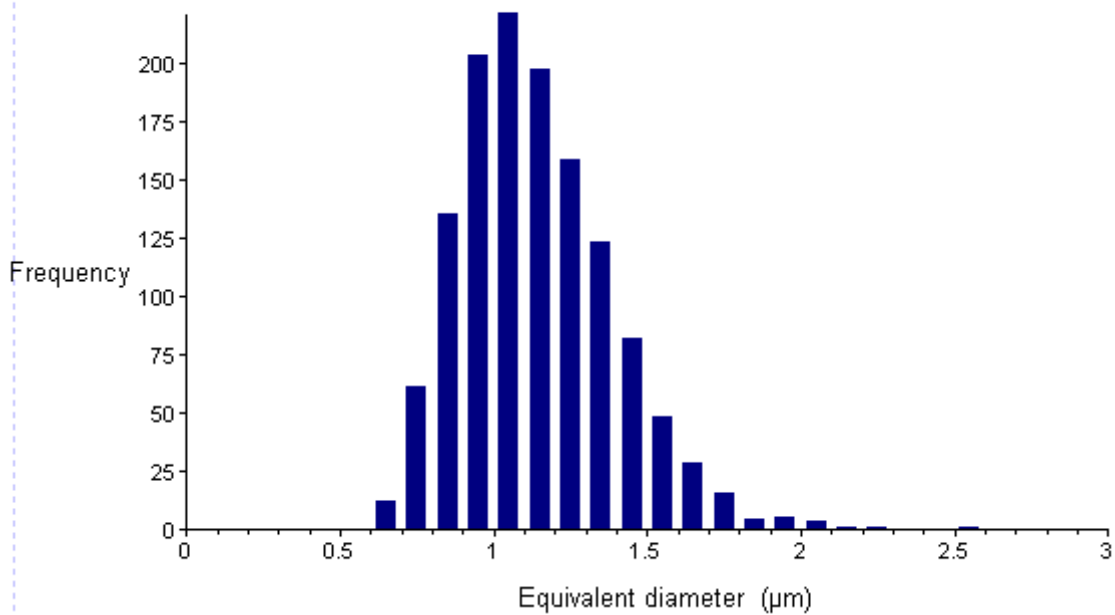


Mean Fluorescence Intensity : 502.84 RFU

SDV Fluorescence Intensity : 138,14

[Ex 465-490nm]/[Em 515-555nm]

Size distribution



Mean Diameter : 1,15 µm

SDV Diameter : 0,26 µm

Expression stochastique du promoteur *rrnC* chez *E. coli* K12 MG1655

Experiment Date 11/02/2014

Filename : AZ32 G2 rrnC 110214a.jp2

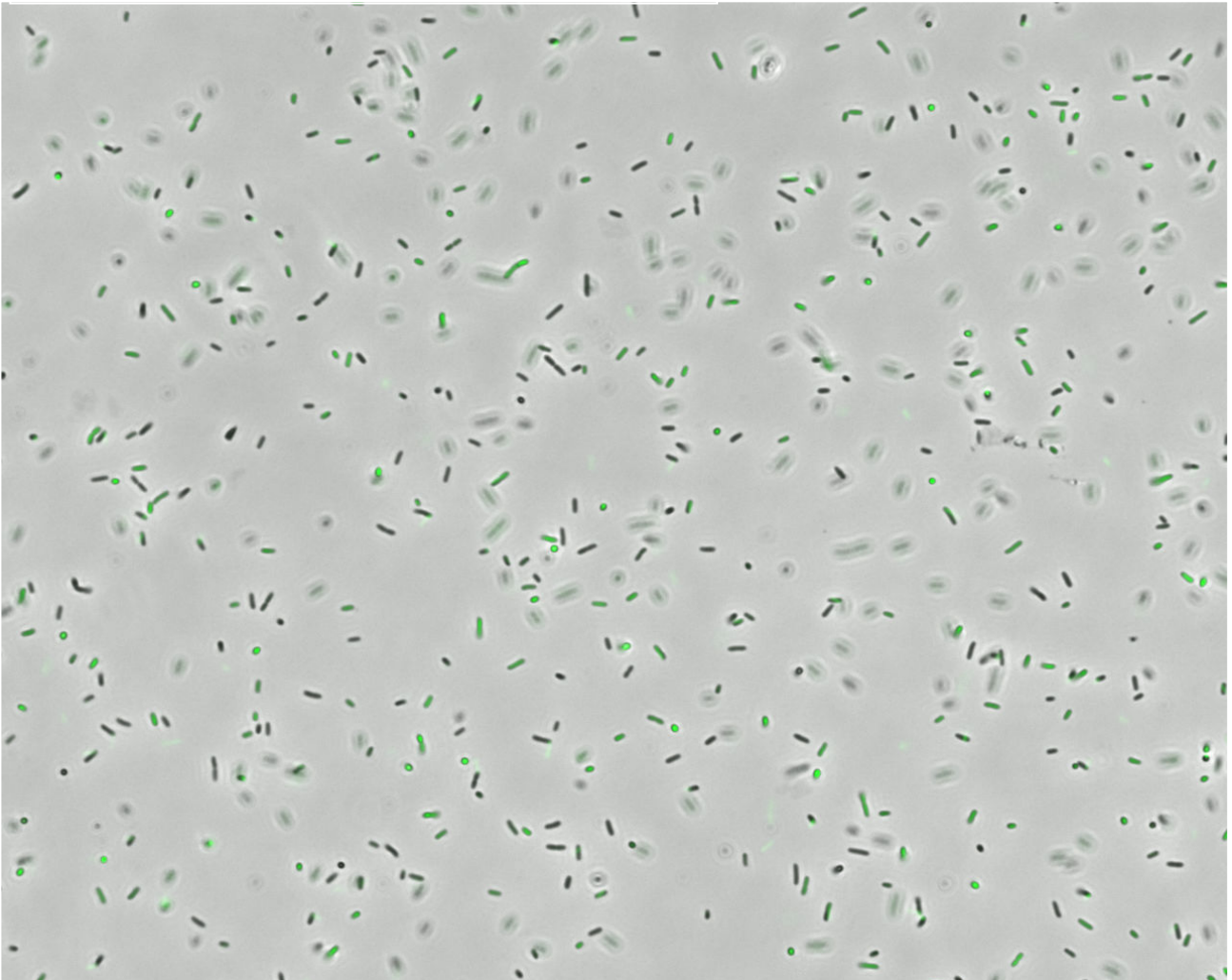
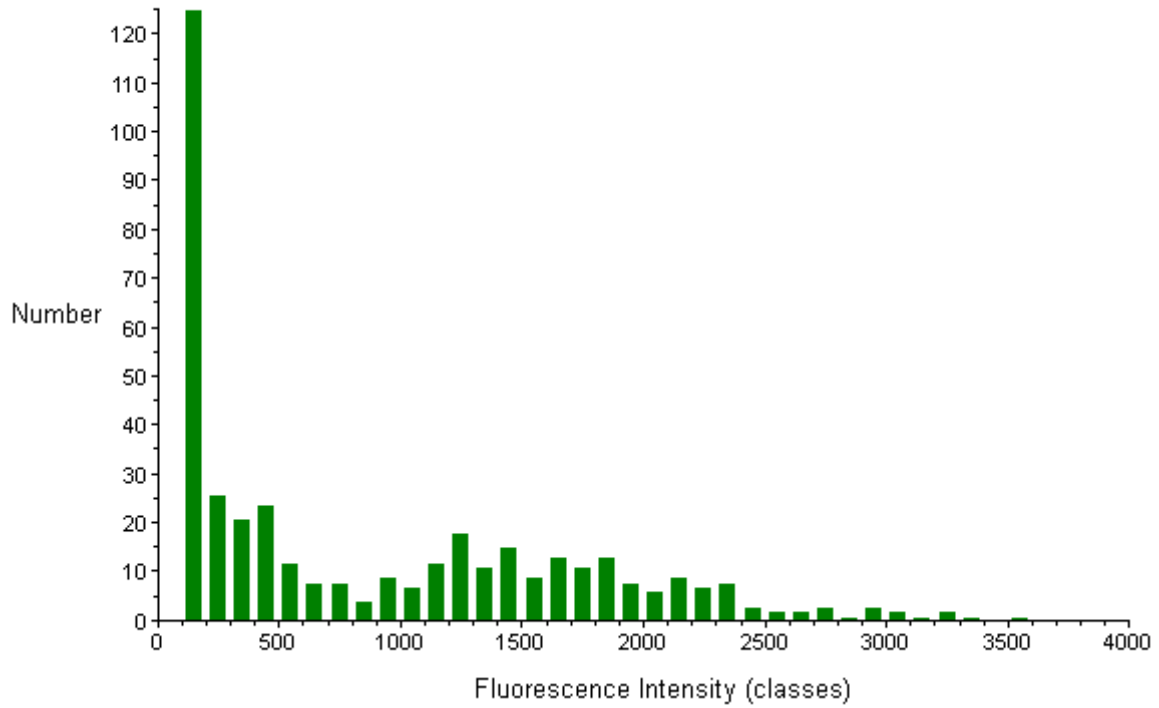


Image size : 1280 x 1024 pixels²
Calibration : 0,16 μm /pixel

Objectif : Plan Fluor 40x Ph2 DLL
Number of cells : 408

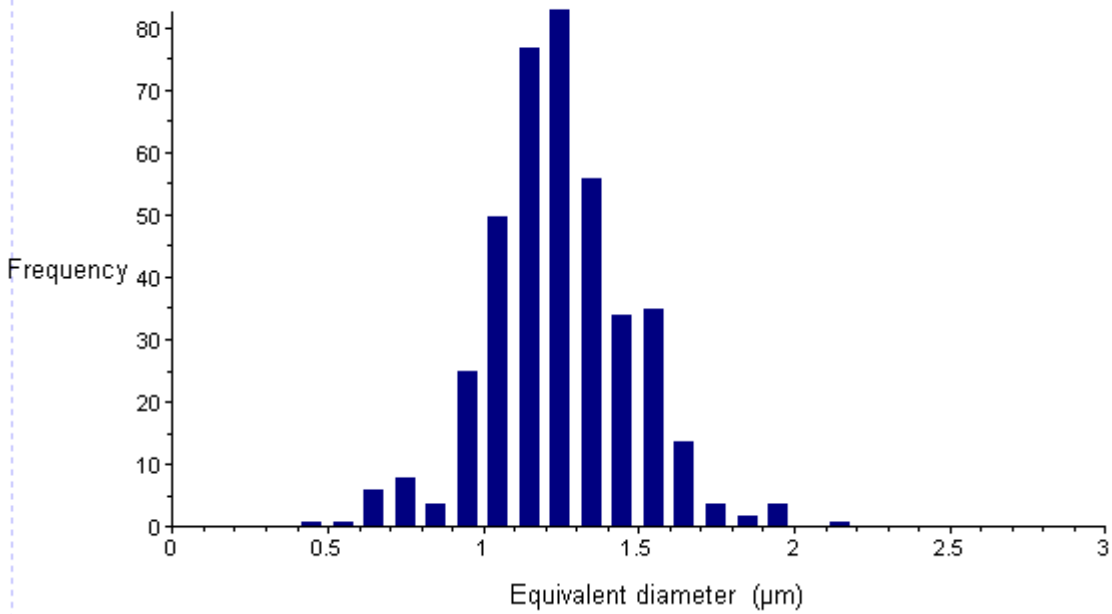
GFP Fluorescence



Mean Fluorescence Intensity : 918,23 RFU
[Ex 465-490nm]/[Em 515-555nm]

SDV Fluorescence Intensity : 835,15

Size distribution



Mean Diameter : 1,25 µm

SDV Diameter : 0,23 µm

Filename : AZ32 G2 rrnC 110214b.jp2

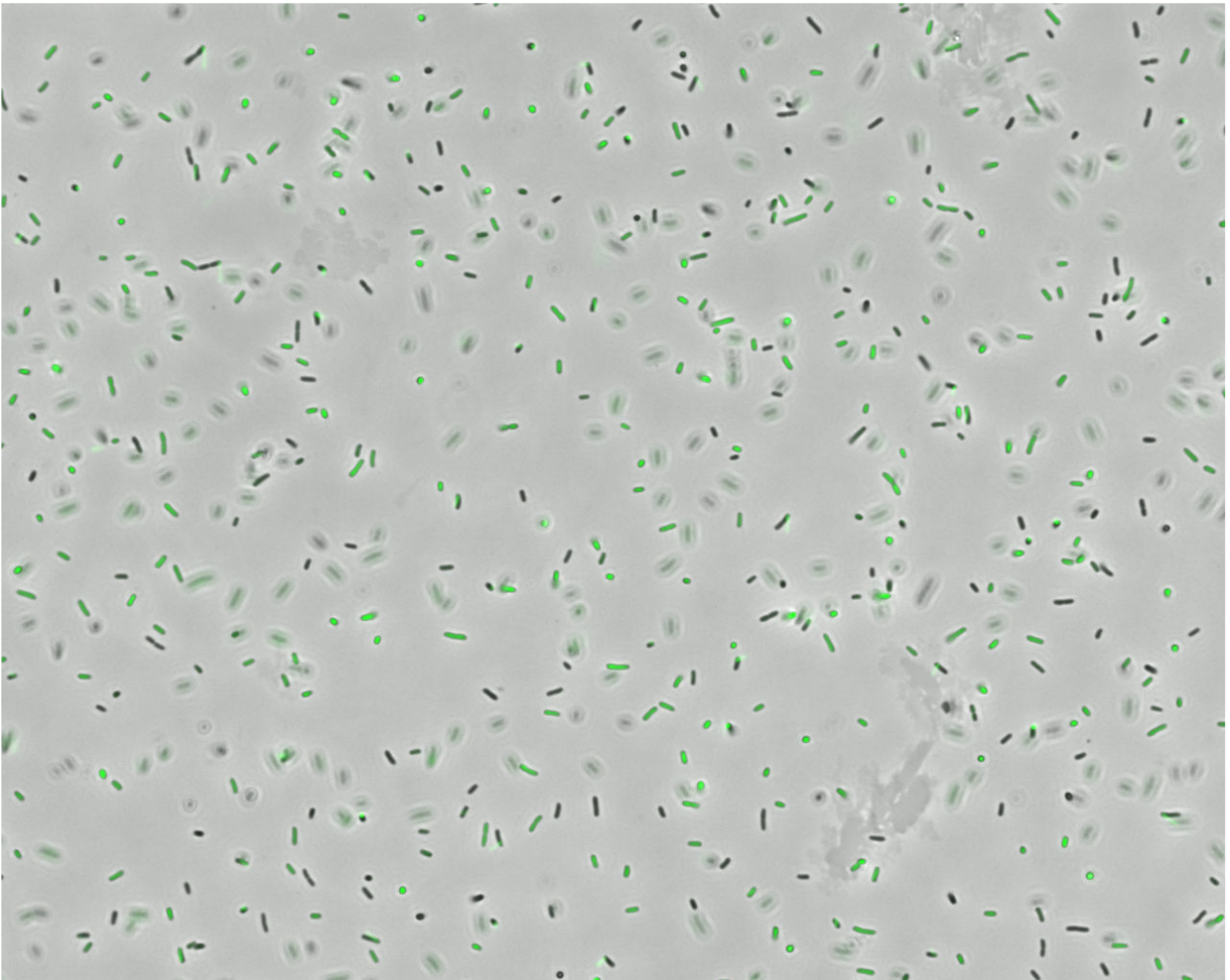
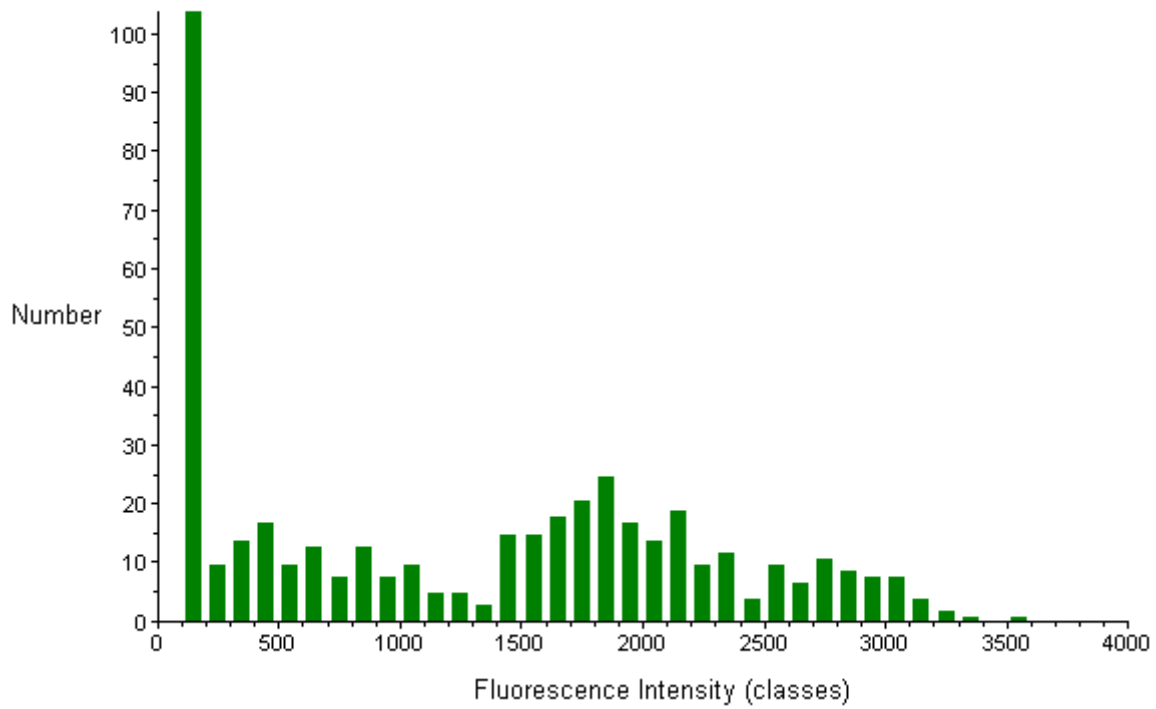


Image size : 1280 x 1024 pixels^2
Calibration : 0,16 $\mu\text{m}/\text{pixel}$

Objectif : Plan Fluor 40x Ph2 DLL
Number of cells : 454

GFP Fluorescence

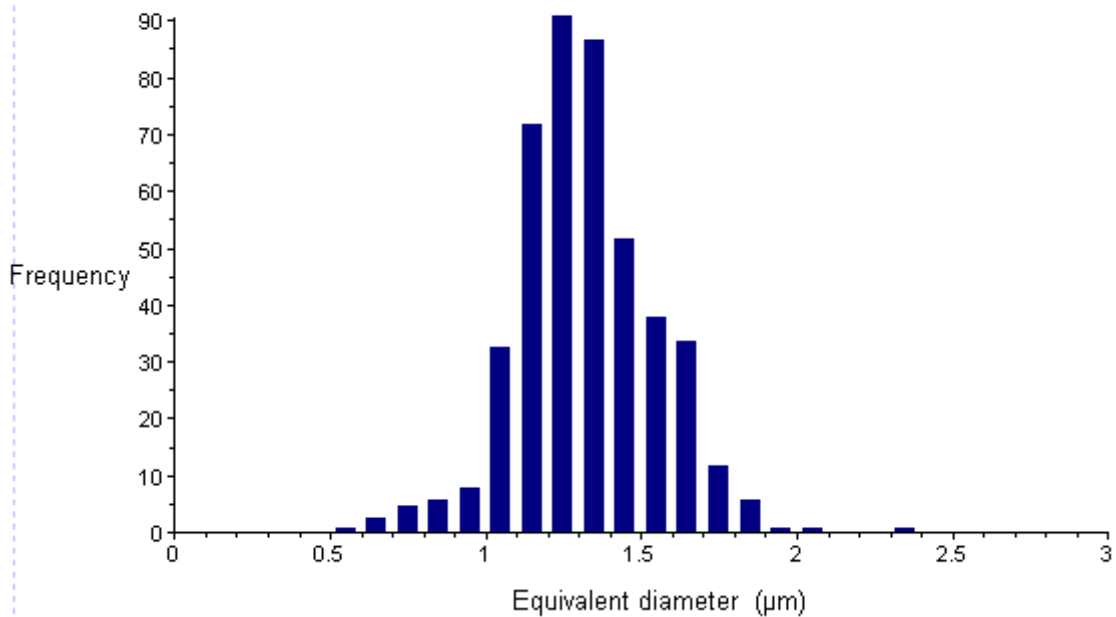


Mean Fluorescence Intensity : 1303,99 RFU

SDV Fluorescence Intensity : 963,1

[Ex 465-490nm]/[Em 515-555nm]

Size distribution



Mean Diameter : 1,32 µm

SDV Diameter : 0,23 µm

Annexe IV : Liste et caractéristiques des 132 promoteurs « mineral responsive » sélectionnés par criblage sur microplaques

Les clones sélectionnés ont été répartis sur 2 microplaques : AZ_31 et AZ_32.

Pour faciliter les opérations de calibration, 3 promoteurs de contrôle (serA, wrbA, lacZ) , 2 clones sans promoteur (U139 et U66) et un blanc (Empty) sont disposés systématiquement dans chaque microplaque

Plaque AZ31

Emplacement	Nom du gène	Description
A12	Empty	Empty well
B1	secM	secretion monitor that regulates SecA translation
B2	aroL	shikimate kinase II
B3	serC	3-phosphoserine aminotransferase / phosphohydroxythreonine transaminase
B4	hisL	his operon leader peptide
B5	ygjG	putative acetylornithine aminotransferase, PLP-dependent (2nd module)
B6	cysK	subunit of cysteine synthase A and O-acetylserine sulfhydrylase A, PLP-dependent enzyme
B7	pheL	leader peptide of chorismate mutase-P-prephenate dehydratase
B8	ilvL	ilvGEDA operon leader peptide
B9	ilvC	ketol-acid reductoisomerase, NAD(P)-binding
B10	metA	homoserine transsuccinylase
B11	cysP	ABC superfamily (peri_bind) thiosulfate transport protein
B12	dapA	dihydrodipicolinate synthase
C1	glyA	serine hydroxymethyltransferase (2nd module)
C2	yaaH	putative regulator, integral membrane protein
C3	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
C4	ptsG	multimodular PtsG: PTS family enzyme IIC, glucose-specific (1st module)
C5	aroK	shikimate kinase I
C6	lpd	dihydrolipoamide dehydrogenase, FAD/NAD(P)-binding ; component of 2-oxodehydrogenase and pyruvate complexes; L protein of glycine cleavage complex second part (2nd module)
C7	gnd	gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating (1st module)
C8	icd	isocitrate dehydrogenase in e14 prophage, specific for NADP+ (2nd module)
C9	tktA	transketolase 1 thiamin-binding, isozyme
C10	U139	promoterless strain
C11	talB	transaldolase B (2nd module)
C12	talA	transaldolase A (2nd module)
D1	crp	transcriptional regulator, catabolite activator protein (CAP), cyclic AMP receptor protein (CAMP-binding family), interacts with RNAP
D2	pykF	pyruvate kinase I (formerly F), fructose stimulated (2nd module)
D3	msrB	putative methionine sulfoxide reductase/regulator
D4	rluE	putative ribosomal large subunit pseudouridine synthase
D5	aroP	APC family, aromatic amino acid transporter (2nd module)
D6	b0360	IS21 protein 1
D7	pgi	Phospho glucose isomerase
D8	gadW	putative transcriptional regulator (AraC/XylS family) (2nd module)
D9	tnaC	tryptophanase leader peptide
D10	acnB	aconitate hydratase 2 (2nd module)
D11	yedW	putative transcriptional regulator (OmpR family)
D12	gatY	tagatose 6-phosphate aldolase 2, subunit with GatZ
E1	yrbL	unknown CDS
E2	mhpR	transcriptional activator for 3-hydroxyphenylpropionate degradation (IcIR family)

Emplacement	Nom du gène	Description
E3	feaR	transcriptional activator of 2-phenylethylamine catabolism (AraC/XylS family) (2nd module)
E4	sohB	putative peptidase (2nd module)
E5	fldA	flavodoxin 1
E6	ytfF	putative cationic amino acid transporter (1st module)
E7	ytfL	putative hemolysin-related protein (1st module)
E8	mltD	membrane-bound lytic murein transglycosylase D
E9	deoR	transcriptional repressor for nucleotide catabolism (DeoR family) (2nd module)
E10	adhE	multifunctional multimodular AdhE: acetaldehyde-CoA dehydrogenase (1st module)
E11	fdoG	formate dehydrogenase-O, major subunit (1st module)
E12	yhiD	putative Mg(2+) transport ATPase
F1	clpB	ATP-dependent protease, Hsp 100, part of novel multi-chaperone system with DnaK, DnaJ, and GrpE (2nd module)
F2	ftsH	ATP-dependent zinc-metallo protease (2nd module)
F3	U66	promoterless strain
F4	hslV	peptidase component of the HslUV protease
F5	amyA	cytoplasmic alpha-amylase
F6	yohL	conserved hypothetical protein
F7	yejG	conserved hypothetical protein
F8	guaB	multimodular GuaB: putative membrane protein (2nd module)
F9	bax	conserved hypothetical protein
F10	wrbA	flavodoxin-like protein, trp repressor binding protein
F11	rstA	response regulator (activator) in two-component regulatory system with RstB (OmpR family)
F12	slyB	putative outer membrane lipoprotein
G1	ydhO	putative lipoprotein (1st module)
G2	osmC	resistance protein, osmotically inducible
G3	flk	cell division protein
G4	yebF	conserved hypothetical protein
G5	cfa	cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase (unsaturated-phospholipid methyltransferase) (2nd module)
G6	crI	transcriptional regulator of cryptic genes for curli formation and fibronectin binding
G7	gadB	glutamate decarboxylase, PLP-dependent, isozyme beta
G8	phoH	PhoB-dependent, ATP-binding pho regulon component (2nd module)
G9	ybiH	putative transcriptional repressor (TetR/AcrR family)
G10	insA_7	IS1 protein InsA
G11	iaaA	putative asparaginase
G12	rpsB	30S ribosomal subunit protein S2
H1	lacZ	beta-galactosidase, lac operon

Plaque AZ32

Emplacement	Nom du gène	Description
A12	Empty	Empty well
B1	cspA	major cold shock protein 7.4, transcription antiterminator of hns,
B2	ftsY	multimodular FtsY: membrane binding domain of cell division protein (1st module)
B3	yahM	unknown CDS
B4	gadX	putative transcriptional regulator (AraC/XylS family)
B5	minC	cell division inhibitor; activated MinC inhibits FtsZ ring formation
B6	secE	preprotein translocase IISP family, membrane subunit
B7	ycbK	conserved hypothetical protein
B8	aceB	malate synthase A
B9	evgA	response regulator (activator) in two-component regulatory system with EvgS, regulates multidrug resistance (LuxR/UhpA family)
B10	dppA	ABC superfamily (peri_bind) dipeptide transport protein (1st module)
B11	ymcC	putative synthetase
B12	ydcX	unknown CDS
C1	ppa	inorganic pyrophosphatase
C2	sraB	small RNA
C3	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
C4	cspD	similar to CspA but not cold shock induced, nucleic acid-binding domain
C5	uspE	conserved protein with adenine nucleotide-binding domain (1st module)
C6	uspF	conserved hypothetical protein with adenine nucleotide-binding domain
C7	pitA	PiT family, low-affinity phosphate transporter (1st module)
C8	corA	MIT family, Mg ²⁺ /Ni ²⁺ /Co ²⁺ transport protein (Mg transport system I)
C9	codB	NCS1 family, cytosine transporter (2nd module)
C10	U139	promoterless strain
C11	pitB	PiT family, low-affinity phosphate transporter (1st module)
C12	ydiV	conserved protein
D1	yfdG	CPS-53 prophage, putative integral membrane protein
D2	yfgH	putative outer membrane lipoprotein
D3	yfhL	putative ferredoxin
D4	smpA	small membrane protein A
D5	manX	PTS family, mannose-specific enzyme IIA component (1st module)
D6	tyrP	HAAAP family, tyrosine-specific transport protein
D7	yehF	putative GTP-binding protein
D8	dcd	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate deaminase
D9	yeeE	putative membrane component of transport system (1st module)
D10	proQ	protein that affects activity of ProP transporter
D11	yciT	putative transcriptional regulator (DeoR family) (2nd module)
D12	dusB	conserved protein
E1	panD	aspartate 1-decarboxylase
E2	accB	acetylCoA carboxylase, BCCP subunit, carrier of biotin
E3	feaR	transcriptional activator of 2-phenylethylamine catabolism (AraC/XylS family) (2nd module)

Emplacement	Nom du gène	Description
E4	sohB	putative peptidase (2nd module)
E5	fldA	flavodoxin 1
E6	ytff	putative cationic amino acid transporter (1st module)
E7	ytfL	putative hemolysin-related protein (1st module)
E8	mltD	membrane-bound lytic murein transglycosylase D
E9	deoR	transcriptional repressor for nucleotide catabolism (DeoR family) (2nd module)
E10	adhE	multifunctional multimodular AdhE: acetaldehyde-CoA dehydrogenase (1st module)
E11	fdoG	formate dehydrogenase-O, major subunit (1st module)
E12	yhiD	putative Mg(2+) transport ATPase
F1	dsrA	anti-sense RNA, silencer of rcsA gene, interact with rpoS translation
F2	rpsP	30S ribosomal subunit protein S16
F3	U66	promoterless strain
F4	rpsO	30S ribosomal subunit protein S15
F5	rpsM	30S ribosomal subunit protein S13
F6	rpsJ	30S ribosomal subunit protein S10
F7	rpmB	50S ribosomal subunit protein L28
F8	rplY	50S ribosomal subunit protein L25
F9	rmf	ribosome modulation factor (involved in dimerization of 70S ribosomes)
F10	wrbA	flavodoxin-like protein, trp repressor binding protein
F11	rrnH	16S rRNA
F12	rsd	regulator of sigma D, has binding activity to the major sigma subunit of RNAP
G1	rpsU	30S ribosomal subunit protein S21
G2	rrnC	16S rRNA
G3	yieG	conserved protein (1st module)
G4	rrnD	16S rRNA
G5	ompC	outer membrane protein 1b (ib;c), porin (1st module)
G6	aqpZ	AqpZ - water MIP channel
G7	yebF	unknown CDS
H1	lacZ	beta-galactosidase, lac operon

Liste des figures

Figure 1 : A- Leland C. Clark Jr. (1918–2005); B- Schéma de l'électrode à enzymes immobilisées de Clark.....	11
Figure 2 : Design d'un biosenseur cellulaire de type 1.	18
Figure 3: Design d'un biosenseur cellulaire de type 2..	19
Figure 4 : Illustration du concept réductionniste de la biologie synthétique : décomposer les systèmes biologiques en un assemblage de composants élémentaires. Comparaison avec la démarche d'ingénierie classique.	22
Figure 5 : Biosenseur cellulaire à trois entrées couplant deux souches d' <i>Escherichia coli</i>	24
Figure 6 : Schéma fonctionnel décrivant les types d'informations nécessaires à l'élaboration d'un modèle systémique et soulignant l'importance de l'interaction de certaines branches de la biologie pour leur production.....	26
Figure 7 : Carte de restriction du vecteur pPROBE'-GFP[LVA].	39
Figure 8 : Cartes génétique (A) et de restriction (B) du vecteur pUC18T-mini-Tn7T-Gm. Carte génétique de la cassette initiale NotI présente dans le vecteur pJBA24 et contenant le promoteur P _{A1/04/03}	42
Figure 9 : Isolement de souches E.coli TOP10 exprimant de façon constitutive a : mCherry, b : DsRed, c : td-tomato, d : mOrange2, e : tag-RFP-T)	42
Figure 10: Gels de silice hybride matures conditionnés en atmosphère humide et stérile après autoclavage et synthèse automatisée (Robot Eppendorf epMotion 5070)	49
Figure 11 : Dispositif d'incubation en jarre des microplaques 96 puits	51
Figure 12 : Spectre d'absorbance du Ferrospectral [®] ([3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine, Na ₂] + thioglycolate ammonium) et gamme étalon établie dans l'eau à 565 nm	52
Figure 13 : Spectromètre Xenius FLX (SAFAS, Monaco) équipé d'un porte cuve (10 cuves) et d'une platine porte-échantillon, motorisés et thermo-régulés par circulation de fluide caloporteur (-5° à 80°C).....	54
Figure 14: Plan d'expérience permettant la production de données trilineaires relatives à l'étude de l'activité des promoteurs bfrB et pvdA en fonction de la [FeCl ₃].	56
Figure 15 : Exemple d'une partition de promoteurs sur une des microplaque de la collection de clones fluorescents d' <i>Escherichia coli</i> K12 (Zaslaver, et al. 2006).	57
Figure 16 : Variations des propriétés spectrales des protéines fluorescentes monomériques dérivées de la GFP et de la RFP.....	65
Figure 17 : Observation en microscopie de fluorescence de l'expression différentielle de la GFP (haut) et de E2_orange (bas) chez <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (expression constitutive).	66
Figure 18 : Matrice expérimentale pour la production de données trilineaires à partir de microplaques. S(x, y) représente le spectre mesuré selon la condition définie par les paramètres x et y.	67
Figure 19: Fibres d'un tenseur d'ordre 3 (d'après Kolda, T. G., & Bader, B. W. 2009).....	68
Figure 20 : Tenseur d'ordre 3 de rang 1, X = a°b°c. L'élément (i, j, k) de X est donné par x _{ijk} = a _i b _j c _k	68
Figure 21 : Décomposition CP d'un tenseur d'ordre 3.....	69
Figure 22: Diagramme isoplèthe représentant une matrice d'excitation-émission pour un mélange de 4 biosenseurs (DH10B-pPROBE-NT'lac, DH10B-pPrlacY495 ; pPrlacO561; pPrlacX591).....	73
Figure 23 : Unimodalité et sensibilité des spectres synchrones	74

Figure 24 : Simulation de spectres synchrones obtenus avec des protéines fluorescentes.	75
Figure 25 : Effet du décalage $\Delta\lambda$ choisi sur l'allure du spectre synchrone en fonction de la longueur d'onde d'excitation.....	75
Figure 26 : Représentation schématique de la méthode - Couplage entre les plans d'expériences, la spectroscopie synchrones et la décomposition	77
Figure 27: (A) Jarosite : sulfate de fer(III) $XFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ avec $X=H_3O^+, NH_4^+, K^+, Ag^+$, (B) Hématite , oxyde de fer $Fe_2O_3 + nH_2O$, (C) Nontronite , phyllosilicate dioctaédrique $Na_{0,3}Fe^{3+}_2Si_3AlO_{10}(OH)_2 \cdot 4(H_2O)$.	117
Figure 28 : Représentation 3D du centre peptidyl transférase de l'ARNr 23S.....	118
Figure 29 : Représentation de l'oxydation du $Fe(II)^+$ par <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	118
Figure 30 : (A) Représentation schématique décrivant le mécanisme de transport d'électrons vers le milieu extracellulaire chez <i>Shewanella</i> et <i>Geobacter</i> . (B) Observation au microscope électronique à transmission d'oxydes de Fe(III)	120
Figure 31 : (A) Modele de réduction des oxydes de Fe(III) via l'utilisation de substances humiques comme transporteurs d'électrons. (B) Un exemple d'acide humique.	121
Figure 32 : Les différents systèmes d'acquisition du fer par les bactéries Gram-négatives (Cornelis 2010).	123
Figure 33 : Structures des sidérophores produits par <i>P. aeruginosa</i>	124
Figure 34 : Réduction du Fe(III) structurale de la nontronite NAu-2 dans un GSH « sandwich » par <i>S. odeinensis</i> MR1.....	125
Figure 35 : Identification du statut du fer dans les feuillettes de nontronite dispersés dans les gels de silice (GSH). Comparaison entre GSH-NAu1, GSH-NAu2 et des gels de silice purs (GS). (D'après Esnault 2010).....	126
Figure 36 : Incubation 24h (A) et 48h (B) à 37°C de la souche PAO1_Wt dans du milieu DCAA en présence de particules de nontronites NAu-2 en suspension colloïdale (T2, 1 g/l final). C- Observation en lumière fluorescente (Excitation 480 SP /Emission 530 LP).	127
Figure 37 : Mise en évidence de la production de pigments par les différents mutants de souche PAO1 (Wt) dans différentes conditions expérimentales.....	127
Figure 38 : Spectres d'absorptions réalisés sur les gels GSH-NAu2 incubés en présence des souches PAO1_Wt, PAO1_1 Δ ou PAO1_2 Δ (48h à 37°C dans du milieu DCAA) et sur les surnageants correspondants.....	129
Figure 39 : Photographies en lumière naturelle (A) fluorescente (Excitation 480 SP /Emission 530 LP) (B) de trois cultures de <i>P.aeruginosa</i> PAO1 incubées avec des gels de silices contenant (de la gauche vers la droite) des colloïdes des nontronites, NAu-1 et NAu-2.	130
Figure 40: Expression du biosenseur PAO1_2 Δ bfrB::gfp en présence de particules de nontronite NAu-1 et NAu-2 (T2). L'activité du promoteur bfrB est proportionnelle à la disponibilité du fer pour les bactéries situées à l'intérieur ou à l'extérieur de l'agrégat particule-bactérie.	131
Figure 41: Décomposition CP à 3 sources d'un mélange de particules de nontronite NAu-1 et NAu-2 (T2).	132
Figure 42 : Décomposition CP de la réduction d'un GSH-NAu2 (T2) en présence d'un réducteur puissant (dithionite $Na_2S_2O_4$	132
Figure 43 : Les différentes étapes d'une analyse par micropuce à ADN (d'après Trevino et al. 2007).....	156
Figure 44 : Processus général d'une analyse ARN-seq (d'après Wang et al. 2009)	157
Figure 45 : Visualisation par rétro-éclairage (Ex 480 nm – Em > 530 nm) de la fluorescence d'une sélection de clones, induite en présence de GS (moitié gauche) et du milieu MOPS (moitié droite)	159
Figure 46 : Visualisation par rétro-éclairage (Ex 480 nm – Em > 530 nm) de la fluorescence d'une sélection de clones, induite en présence de NAu-2 (moitié gauche) et du milieu MOPS (moitié droite)	160
Figure 47 : Détermination de l'atténuation générée par la présence de particules de nontronite NAu-2 (NAu-2) ou de gels de silice (GS – GSH) sur l'émission de fluorescence de la GFP (495 nm),.....	160

Figure 48 : Classification des niveaux d'induction des promoteurs en fonction des 4 modalités : MOPS (Milieu seul) ; GS (MOPS + Gel de silice pur) ; GSH (MOPS + Gel de silice dopé en nontronite NAu-2) ; NAu-2 (MOPS + suspension colloïdale de nontronite NAu-2).....	163
Figure 49 : Analyse en composante principale (ACP) après filtrage K-means des promoteurs les plus sensibles (n= 332).	164
Figure 50 : A- Cinétique d'activité des promoteurs rpsP, asd, pheL et hisL dans le milieu MOPS seul. B- Courbe de croissance moyenne des quatre E.coli K12 MG1655 correspondantes. (n = 3).	166
Figure 51 : Variabilité de la forme cellulaire et de l'intensité de fluorescence cellulaire chez trois populations de clones E.coli K12 MG1655.	167

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales catégories d'enzymes utilisées pour le design de biosenseurs catalytiques.....	14
Tableau 2 : Transducteurs et électrodes utilisés pour la réalisation de biosenseurs bactériens à détection électrochimique	16
Tableau 3 : Spécification des principaux gènes et protéines utilisés dans la construction de systèmes rapporteurs	17
Tableau 4 : Limite de détection des principales méthodes d'analyses physico-chimiques (en μM) pour quatre métaux lourds toxiques As, Cd, Pb, Hg.....	20
Tableau 5 : Limites de détection des principaux systèmes génétiques employés pour la réalisation de biosenseurs bactériens à cellules entières.....	21
Tableau 6 : Origines et caractéristiques des souches hôtes utilisées dans ce travail.	38
Tableau 7 : Origines et caractéristiques des plasmides utilisées	40
Tableau 8 : Souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1) utilisées comme biosenseur du fer	41
Tableau 9 : Classification des phyllosilicates en fonction du type de feuillet, du déficit de charges du feuillet (X) par demi-maille et de sa localisation (Tétraédrique ou Octaédrique) ainsi que du taux d'occupation des sites octaédriques (d'après Perronnet, 2004).	44
Tableau 10 : Géométrie des particules de nontronites NAu-1 et NAu-2 dans les suspensions de taille 1, 2, 3 et 4. (d'après Michot et al. 2008). La concentration en particules de nontronite [NAu] des suspensions mères utilisées est indiquée.....	45
Tableau 11 : Récapitulatif des volumes respectifs (en ml) de chaque solution utilisées pour la préparation des Gels de silice hybrides	47
Tableau 12 : Caractéristiques géométriques moyennes (n =29) des gels de silice de silice purs (GS) déterminées par analyse d'images.....	47
Tableau 13 : Solutions « Stocks » pour la préparation des différents milieux et des plans d'expériences à stocker à température ambiante.....	49
Tableau 14 : Solutions d'éléments essentiels (micro-nutriments) à préparer pour la fabrication du milieu MOPS - A stocker à température ambiante	50
Tableau 15: Résultats ICP des surnageants propre à chaque souche pour la condition GSH-NAu2 pour l'élément fer.....	129
Tableau 16 : Facteurs de correction moyens (S_h) retenus et appliqués pour l'inter-comparaison des expressions des activités des promoteurs entre modalité.	161
Tableau 17 : Classification de l'expression des activités des promoteurs (sur 10 groupes)..	163
Tableau 18 Classification optimale de l'expression des activités des promoteurs actifs (6 groupes).....	164
Tableau 19 : Fonctions cellulaires des principaux promoteurs identifiés et aux activités différentiables. Le taux d'identité (similitude) chez <i>P.aeruginosa</i> PAO1 est indiqué en %.	165
Tableau 20 : Résumé des avantages et inconvénients du couplage PF/SFS/CP (protéines fluorescentes, spectrométrie synchrone, décomposition polyadique canonique)	175

Résumé :

Le monitoring des écosystèmes terrestres nécessite une connaissance approfondie des interactions entre microorganismes, minéraux et métaux dans les sols. Afin d'évaluer *in vivo* la disponibilité de métaux tel que le fer dans des systèmes bactéries-minéraux, une approche basée sur l'utilisation de biosenseurs bactériens fluorescents et d'une analyse spectroscopique non-invasive a été explorée. Ce travail a notamment conduit à la construction chez *Pseudomonas aeruginosa* de fusions génétiques couplant des promoteurs régulés par le fer à des rapporteurs fluorescents multicolores. Les souches obtenues ont été utilisées comme senseur de la disponibilité du fer constitutif de différents minéraux (Nontronites). La réponse de ces biosenseurs bactériens a été étudiée en couplant la spectroscopie de fluorescence à balayage synchrone (SFS) à la décomposition canonique polyadique Candecomp / Parafac (CP). Avec des plans d'expérience privilégiant la diversité des réponses, le couplage SFS-CP garantit une estimation conjointe et rapide de l'expression de plusieurs promoteurs d'intérêts, y compris dans des milieux auto-fluorescents. Cette méthode originale permet, entre autres, de s'affranchir des problèmes liés aux recouvrements spectraux des protéines fluorescentes et fournit une estimation robuste et précise de la réponse des biosenseurs. Appliquée à d'autres plans d'expériences, elle démontre également que la bio-dissolution des nontronites par *P. aeruginosa* est assurée par la production de sidérophores et contrôlée par la cristallographie des feuillettes des smectites, notamment par la distribution des atomes de fer(III) entre les tétraèdres et les octaèdres.

Mots-clés : biosenseurs bactériens, protéines fluorescentes, nontronite, spectroscopie synchrone, décomposition polyadique, *Pseudomonas aeruginosa*, bio-alteration.

Multicolour whole-cell bacterial sensors for *in vivo* identification of biophysicochemical interactions in mineral-bacteria systems.

Abstract:

Monitoring terrestrial ecosystems requires a better understanding of the interactions between microorganisms, minerals and metals in the environment. To assess *in vivo* availability of metals such as iron in bacteria-mineral system, an approach based on whole-cell fluorescent biosensors and non-invasive spectroscopy was explored. This work led to the construction in *Pseudomonas aeruginosa* of a set of gene fusions coupling iron-regulated promoters to multicolour fluorescent reporters. The recombinant strains were used as sensors of structural iron availability in nontronites NAu-1 and NAu-2. The response of these biosensors was studied by coupling synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) with canonical polyadic Candecom/Parafac (CP) decomposition. On the basis of experimental designs favouring response diversity, the coupled SFS-CP method guarantees a joint estimate of gene expression from multiple promoters, even in highly fluorescent media. This novel method can solve the issue of spectral bleed-through of fluorescent proteins and provides a means to integrate multiple signals from combinations of whole-cell fluorescent bioreporters. In addition, we could show using SFS-CP that *P. aeruginosa* indirectly mobilize Fe(III) from nontronites primarily through the production of pyoverdine siderophore. The structural Fe(III) present on the edges of NAu-2 rather than NAu-1 particles appears to be more bioaccessible, suggesting that the distribution of Fe, in the tetrahedron and/or in the octahedron sites, governs the solubilization process.

Keywords: whole cell bacterial sensors, fluorescent proteins, nontronite, synchronous spectroscopy, polyadic decomposition, *Pseudomonas aeruginosa*, bioweathering.