



**HAL**  
open science

# Biosenseurs bactériens bioluminescents pour la détection de métaux en solution : mesurer et formaliser les relations entre réponse temporelle des biosenseurs, métabolisme cellulaire et biodisponibilité/spéciation des métaux

Eva Delatour

## ► To cite this version:

Eva Delatour. Biosenseurs bactériens bioluminescents pour la détection de métaux en solution : mesurer et formaliser les relations entre réponse temporelle des biosenseurs, métabolisme cellulaire et biodisponibilité/spéciation des métaux. Sciences de l'environnement. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0310 . tel-04700419

**HAL Id: tel-04700419**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04700419v1>**

Submitted on 17 Sep 2024

**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.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## 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 bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## 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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE

SIReNa



Laboratoire Interdisciplinaire des  
Environnements Continentaux  
LIEC – CNRS UMR 7360

Université de Lorraine  
Ecole doctorale SIReNa - Sciences et  
Ingénierie des Ressources Naturelles

## THESE

Pour l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Soutenue publiquement par

**Eva DELATOUR**

Le 20 DECEMBRE 2023

**Biosenseurs bactériens bioluminescents pour la détection de  
métaux en solution : mesurer et formaliser les relations  
entre réponse temporelle des biosenseurs, métabolisme  
cellulaire et biodisponibilité/spéciation des métaux**

### Membres du jury :

Directeur de thèse	Jérôme F.L. Duval	DR CNRS, LIEC, Université de Lorraine
Co-Directeur de thèse	Christophe Pagnout	MCF, LIEC, Université de Lorraine
Rapporteur :	Bruno Lartiges	Prof., GET, Université de Toulouse
Rapporteuse :	Barbara Schoepp-Cothenet	DR CNRS, BIP, Aix-Marseille Université
Présidente du jury :	Laure Giambérini	Prof., LIEC, Université de Lorraine
Examinatrice :	Agnès Rodrigue	MCF, MAP, INSA Lyon



# Remerciements

Il est temps pour moi de prendre un moment pour exprimer ma profonde reconnaissance envers tous ceux qui ont joué un rôle essentiel dans mon « périple doctoral ». Votre impact sur cette aventure va bien au-delà des mots, et je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

A **Laure Giambérini**, directrice du laboratoire, je tiens à te remercier pour nos nombreuses discussions lors de mon mandat en tant que représentante des non-permanents mais également pour tes conseils et ton soutien jusqu'à la « dernière minute » de cette aventure.

A mes très estimés directeurs de thèse, **Jérôme Duval et Christophe Pagnout**. Je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements pour votre rôle EXCEPTIONNEL en tant que directeurs de ma thèse. L'aboutissement de ce parcours académique ne pourrait être célébré sans reconnaître l'influence déterminante que vous avez eue sur cette aventure. Votre disponibilité constante, votre patience infinie et votre engagement ont été des piliers essentiels tout au long de cette période. Vos conseils éclairés, vos critiques constructives et votre volonté de partager vos connaissances ont non seulement enrichi ma thèse, mais ont également façonné ma vision et ma compréhension du sujet. Au-delà de vos rôles académiques, je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour le soutien émotionnel que vous m'avez accordé. Votre confiance en mes capacités a été moteur puissant qui m'a encouragé à persévérer dans les moments de doutes et de difficultés. J'ai eu une chance incroyable de vous avoir !  
MERCY !

Aux membres de mon comité de suivi de thèse, **Grégory Francius et David Gonzalez Rodriguez**. Je tiens à vous remercier pour le temps que vous m'avez consacré, pour vos commentaires éclairés et vos conseils avisés qui ont grandement contribué à façonner la qualité et la pertinence de mes recherches. Les discussions stimulantes lors de nos rencontres ont représenté des moments cruciaux de réflexion et ont eu un impact significatif sur ma thèse.

Aux membres de mon jury de thèse, **Bruno Lartiges, Barbara Schoepp-Cothenet, Agnès Rodrigue et Laure Giambérini**. Je vous remercie grandement d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et de vous être déplacé pour ma soutenance. Je vous remercie également pour vos questions pertinentes lors de la soutenance qui ont été pour moi une source d'enrichissement intellectuel.

Un remerciement sincère à toute l'équipe PhySI et particulièrement à **Céline Caillet, Elise Rotureau et José Paulo Pinhero** pour votre contribution directe aux résultats de cette thèse. Je suis reconnaissante pour le temps que vous avez consacré à la biologiste que je suis afin de me former dans

les domaines de l'électrocinétique, de l'électrochimie et des logiciels de calcul de spéciation. Votre expertise a été précieuse pour la réussite de ce travail. Un grand merci à vous !

Une pensée toute particulière pour toi **Marie**, merci pour tous ces moments de vie au labo qui n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, tes petits mots trop choupi sur le tableau et ta contribution aux résultats de cette thèse. Merci aussi pour ces quelques moments hors labo, fête de la saint Jean, Vosgie et brunch du dimanche. J'attends avec impatience qu'on remette ça.

Un grand merci à vous **Catherine Pierson et Catherine Drui** pour le temps infini que vous avez consacré à mes OM et mes questions sur le fonctionnement du laboratoire. Je te remercie tout particulièrement Catherine Pierson pour nos discussions, pour tes conseils et ton soutien.

Enfin, cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle a été sans mes très chers collègues doctorants et post-doctorants. Merci **Vinita** pour nos discussions en français ET EN ANGLAIS qui m'ont aidé à m'améliorer. La bête noire que représentait l'anglais l'est un peu moins grâce à toi. **Nicolas Lachaux (chamallow), Manu (petite mousse), Rodrigue**, merci à vous pour ces soirées au bar pré-covid, pour votre bonne humeur et vos conseils lors de mes débuts de thèse. Petite pensée pour toi Joey qui a passé quelques mois dans notre bureau. Ta bonne humeur et ta folie ont été un rayon de soleil lors des nombreux jours grisous typiques de la Lorraine. **Sarah (ma coloc), Elsa, Nico D, Ludo, Sam et Hélène**, merci à vous pour tous ces moments passés « au nid ». Je suis à peine parti que vous me manquez déjà ! On a vécu tellement de choses... des moments de joies, de stresses et de tristesses, de chafouinage !!! Mais nous avons toujours été là les uns pour les autres. Et c'est là toute la beauté de l'amitié que nous avons créée ! Merci à vous tous !!!! Merci aussi pour tous ces moments hors labo, les sorties urbex, les soirées thématiques notamment Halloween et les soirées culinaires (sushi, crêpes, triple fondues et nos incroyables Brunch du dimanche). Je suis de tout cœur avec vous pour la fin de vos thèses et reste une épaupe, une oreille et un pied à terre lors de votre passage en Indre et Loire et en Anjou. Une pensée pour vous **Vincent, Thibault, Aliénor, Margot, Manon, Jérémie**, et tous les autres que je n'ai pas eu le temps de rencontrer. Je vous souhaite bon courage pour vos thèses et/ou la suite de vos projets professionnels. **Lorenzo** (stagiaire M1, M2 et maintenant doctorant), merci de ton implication dans les résultats de cette thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite !!! « Force et honneur »

**Nico** (ponlonais :D), chaque doctorant à son binôme et même si nous n'étions pas sur le même site, je te considère comme tel. Il faut le dire, tu es un sacré personnage !!! Mais c'est ce que j'apprécie chez toi. Ta bonne humeur, ta bienveillance, ta générosité « mal reconnue » font de toi une personne exceptionnelle. Surtout ne change pas. Merci d'avoir été là pour moi dans les moments difficiles. La thèse n'aurai pas été la même sans toi. Je n'ai plus mon appart sur Metz mais sache que ma porte te sera toujours ouverte et ton lit toujours prêt peu importe où je me trouve !!! :D

Mille merci **Justine (Fayoouu)** pour tous ces bons moments vécus au labo et en dehors. Ton implication dans la vie du labo et dans son animation a été un plus dans les moments où le covid ne nous permettait pas de sortir !!! J'attends avec impatience notre prochaine session lightpainting spécial saint Valentin !!! **Anne**, merci à toi pour ta bonne humeur et tes passages au bureau dès que tu en avais l'occasion !!! **Laetitia**, je ne t'oublie pas !!! Merci pour nos nombreuses conversations et ton écoute. Je te souhaite le meilleur dans tes projets professionnels.

**Kevin C**, ton passage au LIEC fut de courte durée mais tu as eu le temps de marquer quelques esprits. Merci à toi d'avoir partagé tes connaissances en botanique lors de nos sorties glanages (baies, champignons, noix, fragments de mines :D). Ton intérêt pour l'histoire et les « vieux machins » ont rendu nos sorties et conversations encore plus passionnantes. Même si tu n'en a clairement pas besoin, je tiens à te souhaiter bonne chance pour ton HDR.

Un grand merci également à vous, **Béné, Sandrine**, et à tous les autres, pour vos paroles rassurantes et encourageantes, ainsi que pour les échanges précieux que nous avons partagés. **Nathalie**, je tiens à exprimer ma gratitude pour ta gentillesse, ta bienveillance, les délicieux cafés et les petits chocolats de la Saint-Nicolas.

**Marco, Lolo**, un immense merci pour votre soutien indéfectible, votre assistance précieuse et votre disponibilité constante. Je vous suis redevable de bien des façons, et aucun mot ne peut véritablement exprimer ma gratitude. Un grand merci à vous **Sam, Quentin, Max, Fetta, Delphy** et tous les autres qui ont cru en moi et m'ont soutenu même de loin !

Enfin, merci à ma famille. Merci à mes chats (**Kevin et Nun**) qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse. Merci de croire en moi, de me supporter :D et d'être toujours présents après autant d'années <3 Merci à mes parents pour avoir été là dans les moments difficiles, pour vos bons petits plats me donnant la force de finaliser ce manuscrit (« manger, bon manger ») et pour tout ce que vous avez fait pour moi tout au long de ma vie !!! <3 Merci à vous **Yo, Eli et les grumeaux** d'avoir été mes pom-pom boys/girls pour cette dernière ligne droite et d'avoir fêter ça avec un feu d'artifice digne des plus grands XD Je vous aime tous <3 <3 <3





# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Synthèse bibliographique .....</b>	<b>7</b>
1. Bioluminescence bactérienne.....	9
1.1. Fonctionnement de la bioluminescence bactérienne.....	9
1.2. Opérons impliqués dans la réactions de bioluminescence .....	12
2. Biosenseurs bactériens bioluminescents.....	12
2.1. Utilisation des biosenseurs naturellement bioluminescents pour la surveillance de l'environnement.....	19
2.2. Utilisation des biosenseurs bioluminescents génétiquement modifiés pour la surveillance de l'environnement.....	16
3. Evaluation de la spéciation/biodisponibilité des métaux.....	27
3.1. Qu'est-ce que la biodisponibilité .....	27
3.2. Modèles à l'équilibre thermodynamique .....	28
3.3. Modèle dynamique de spéciation des métaux.....	31
3.3.1. Cas des ligands moléculaires.....	31
3.3.2. Cas des ligands nanoparticulaires.....	35
3.4. Biosenseurs bactériens bioluminescents à détection de métaux.....	38
3.4.1. Stratégie de construction et fonctionnement.....	38
3.4.2. Exploitation du signal de bioluminescence .....	39
4. Objectifs.....	45
<b>Chapitre 2. Matériels et méthodes expérimentales.....</b>	<b>60</b>
1. Biosenseurs bactériens bioluminescents.....	61
1.1. Souche hôte utilisée.....	61
1.2. Plasmide et constructions génétiques.....	61
2. Milieux utilisés.....	62
3. Luminométrie.....	63
4. Culture bactérienne.....	64
5. Modulation de la qualité nutritionnelle des milieux : effets sur la bioluminescence.....	65
6. Modulation des conditions de spéciation et des conditions de déplétion de métal en solution au cours du temps dans les essais de bioluminescence .....	66
6.1. Ligands utilisés (chélateurs de Cd).....	67
6.2. Essais de bioluminescence à basse salinité en présence de ligands moléculaires ou particuliers .....	68

6.3 Essais de bioluminescence à haute et basse salinité en présence de ligands moléculaires .....	71
7. Caractérisation physicochimique des ligands particuliers (chélateurs de Cd).....	73
7.1. Mesure de la mobilité électrophorétique des ligands particuliers par microélectrophorèse...	73
7.2. Mesure de la taille des ligands particuliers par Diffusion de la Lumière.....	75
<b>Chapitre 3. Influence de la biodisponibilité et de la qualité des nutriments sur le signal temporel de bioluminescence : cas des biosenseurs spécifiques inductibles au Cd.....</b>	<b>77</b>
Résumé en français.....	78
Abstract .....	83
1. Introduction.....	83
2. Materials and methods.....	86
2.1. Luminescent whole-cell bacterial reporters.....	86
2.2. Cell growth condition, and media composition adopted for the bioluminescence assays .....	86
2.3. Bioluminescence measurements.....	87
3. Bioluminescence response of metal whole-cell biosensors: interpretative framework.....	87
3.1. Theoretical expression for the bioluminescence.....	87
3.2. Methodology for quantitative reconstruction of measured time-dependent bioluminescence signals.....	90
4. Results and discussion .....	90
4.1. Impacts of nutritive conditions on the modality of the bioluminescence signal.....	90
4.2. Impacts of nutritive conditions on bioluminescence maxima.....	95
4.3. Origin of the observed modulations of the bioluminescence signal with time and metal concentration : interplay between stringent response and catabolite repression .....	99
4.4. On the connection between bioluminescence response of metal-sensing cells, cell photoactivity and nutrient conditions .....	102
5. Conclusions.....	106
Supplementary Materials.....	111
<b>Chapitre 4. Influence de la qualité nutritive du milieu sur la réponse temporelle de bioluminescence : comparaison des activités métaboliques cellulaires de biosenseurs spécifiques inductibles au Cd et de leurs équivalents non spécifiques.....</b>	<b>120</b>
Résumé en français.....	121
Abstract .....	128
1. Introduction.....	128
2. Materials and methods.....	131
2.1. Luminescent whole-cell bacterial reporters.....	131
2.2. Cell growth condition, and nutritive medium composition in bioluminescence assays .....	131
2.3. Bioluminescence measurements .....	131

3.	Theory.....	132
3.1.	Kinetics of bioluminescence emission by non-specific <i>lux</i> -biosensors involving a constitutive promoter .....	132
3.2.	Comparison with bioluminescence expression for metal-inductible whole-cell <i>lux</i> -biosensor.....	134
3.3.	Inferring time-dependent photoactivity of constitutive cells from their bioluminescence signal.....	135
4.	Results and discussion.....	136
4.1.	Description of the time-dependent response of non-specific <i>rrnB</i> P1- <i>luxCDABE E.coli</i> sensors versus nutritional medium conditions.....	136
4.2.	Rationale for the dependence of constitutive cell response on time .....	140
4.2.1.	Mechanistic correspondence between bioluminescence signals of constitutive and non-constitutive cells .....	143
4.2.2.	Comparison between time-dependent cell photoactivity profiles for constitutive and non-constitutive cells .....	145
5.	Conclusions.....	147
	<b>Chapitre 5 : Détermination des propriétés de biodisponibilité et de spéciation de métaux à partir de l'analyse du signal temporel de bioluminescence de biosenseurs bactériens spécifiques : étude préliminaire.....</b>	<b>152</b>
1.	Effet de la concentration bactérienne sur le signal de bioluminescence.....	156
2.	Effet de la concentration en ligands sur le signal de bioluminescence – Cas des ligands moléculaires .....	156
3.	Effet de l'électrostatique sur le signal temporel de bioluminescence.....	158
4.	Effet de la concentration en ligands sur le signal de bioluminescence – Cas des ligands particulières .....	160
5.	Conclusions .....	163
	<b>Annexe relative au Chapitre 5 - Biophysicochemical kinetics of metal detection by luminescence-based whole-cell biosensors: connecting biosensor response to metal bioavailability, speciation and cell metabolism .....</b>	<b>166</b>
	Graphical abstract.....	167
	Abstract.....	168
1.	Introduction .....	169
2.	Dynamics of biointerfacial metal partitioning governing equations, results and discussion.....	172
2.1.	Setting the stage .....	172
2.2.	Metal bioavailability at the biosensor/solution interface under bulk metal depletion condition .....	174
2.2.1.	Extracellular distribution of metal species, expression of metal supply flux at the biosensor surface.....	174

2.2.2. Expressions for the metal biouptake flux, and the time-dependent concentrations of free metal species in bulk solution, at the surface and in the intracellular body of the metal-accumulating bacteria.....	177
2.2.3. Bulk metal depletion: timescales and equilibrium situation .....	179
2.2.4. Metal bioavailability.....	184
3. Connections between metal partitioning dynamics at the biosensor/solution interface and bioluminescence signal.....	189
3.1. Theoretical formulation.....	189
3.2. Effects of cell volume fraction on the bioluminescence signal $Lum(t)$ .....	191
3.3. Effects of ligand concentration on the bioluminescence signal $Lum(t)$ .....	198
4. Conclusions and perspectives .....	200
Supplementary information .....	207
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>211</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>216</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>219</b>



# *Introduction*

Les systèmes environnementaux sont soumis à différentes pressions d'origines naturelles ou anthropiques entraînant une contamination parfois importante des milieux et une perturbation de leur fonctionnement. En raison de leur omniprésence, de leur persistance et de leurs effets toxiques potentiels, les polluants à l'état de trace, comme les métaux, nécessitent de disposer d'outils précis pour les détecter et les quantifier. Néanmoins, les outils/méthodes classiquement utilisés (*e.g.* méthodes physicochimiques, essais de toxicité, calculs de spéciation basés sur les modèles à l'équilibre thermodynamique) ne permettent pas à eux seuls d'évaluer avec précision la fraction biodisponible des métaux.

Au cours des dernières décennies, l'utilisation de biosenseurs bactériens bioluminescents s'est avérée être une alternative intéressante. Ces derniers sont généralement des micro-organismes génétiquement modifiés pour émettre des photons en réponse à un stress général, à un stress donné (*e.g.* dégât à l'ADN, membrane) ou à un analyte cible (*e.g.* un ion métallique biodisponible). La construction génétique des biosenseurs repose généralement sur des mécanismes de défense ou de résistance. Dans le cas de biosenseurs bactériens bioluminescents à détection de métaux, des gènes rapporteurs *lux* (luciférase bactérienne) sont fusionnés à un promoteur dont l'expression est régulée par une protéine régulatrice ayant une forte affinité pour l'élément métallique ciblé. En présence du métal cible, la protéine régulatrice forme un complexe avec l'ion métallique, permettant ainsi l'expression des gènes rapporteurs et par conséquent l'émission de la luminescence. De nombreux biosenseurs ainsi construits permettent la détection de divers métaux (*e.g.* cadmium, plomb, cuivre, arsenic) avec des limites de détection de quelques nM à la dizaine de  $\mu\text{M}$ .

Cependant, peu nombreux sont les biosenseurs qui ont fait l'objet de réalisations commerciales ou de tests en milieux naturels. Ceci s'explique principalement par la complexité des différents processus biologiques et physicochimiques intra- et extra-cellulaires qui définissent la répartition des métaux à l'interface formée entre le biosenseur et le milieu extracellulaire, la cinétique d'émission de bioluminescence qui s'ensuit, et la difficulté d'établir une formulation biophysique explicite de ces différents processus couplés et non linéaires. Autrement dit, la difficulté réside, entre autres, dans : l'évaluation des cinétiques des réactions biochimiques intracellulaires qui conduisent à l'émission de photons, la formalisation de la biodisponibilité des espèces métalliques dans le milieu extracellulaire et du flux correspondant de bioaccumulation des métaux. Cette biodisponibilité et flux sont évidemment fonction de la spéciation des métaux, *i.e.* formes libres ou complexés, et de la labilité des complexes métalliques, définie comme étant la facilité à se dissocier - dans une fenêtre temporelle donnée - à proximité de la surface des biosenseurs et à contribuer au flux de bioaccumulation de métaux. Ces derniers points impliquent de prendre en compte (i) les processus dynamiques qui régissent le transport des métaux de la solution vers la membrane

cellulaire et les cinétiques d'association et de dissociation du métal avec les ligands moléculaires et/ou particuliers en solution, et (ii) la qualité et la biodisponibilité des nutriments qui selon la composition du milieu, la concentration cellulaire et les interactions *e.g.* avec les métaux permettent le maintien de la viabilité cellulaire et la production de luminescence en fournissant les besoins énergétiques nécessaires.

Les méthodes actuellement employées consistant à exploiter des courbes de calibration ou à utiliser des modèles à l'équilibre type Biotic Ligand Model (BLM) ne permettent pas nécessairement et de façon générique d'établir un lien quantitatif entre concentration en métaux biodisponibles et intensité de luminescence générée par les biosenseurs. En particulier, ces méthodes ne tiennent pas compte de la contribution possible des complexes métalliques au flux de bioaccumulation (*i.e.* de leur labilité qui est une notion dynamique par nature), des exigences énergétiques permettant de produire et maintenir la bioluminescence, ou encore de la déplétion possible des métaux en solution au cours du processus de bioaccumulation. Ce dernier processus se traduit par une diminution de la concentration en métal dans le milieu aqueux (*bulk*) au cours du temps (et donc nécessairement une diminution de sa biodisponibilité), et ce même si l'une des hypothèses fondatrices des modèles types BLM est respectée, à savoir l'hypothèse *formulée a priori* selon laquelle les activités (ou les potentiels électrochimiques) des métaux en solution et à la surface des biosenseurs sont égales.

A ce jour, quelques travaux (*e.g.* **Pagnout *et al.*, 2018 ; Duval & Pagnout, 2019, 2020**) ont permis d'établir un cadre théorique - valable pour des milieux faiblement complexant pour les métaux - qui explique comment la réponse temporelle de bioluminescence est déterminée par le flux de bioaccumulation de métaux, par la cinétique d'expression des gènes rapporteurs *lux*, par le taux de production et de dégradation de la luciférase et par la cinétique d'émission de photons qui en découle. Ces auteurs ont couplé expérimentations et modélisations théoriques afin de reproduire la réponse temporelle de biosenseurs *Escherichia coli* contenant la fusion des gènes *zntA-luxCDABE* inductibles par le Cd(II) dans différentes conditions contrôlées incluant les modulations de la force ionique du milieu, de la concentration cellulaire, des charges électrostatiques de surface des biosenseurs et de la qualité nutritive du milieu et ce, dans le régime de bioaccumulation dit de Henry qui correspond à une réponse linéaire des biosenseurs avec la concentration de cadmium en solution. Point très important, ce formalisme théorique a permis de démontrer que la réponse temporelle des biosenseurs n'était pas linéairement corrélée à la photoactivité cellulaire (définie comme la capacité d'un biosenseur à produire de la lumière) mais qu'elle en dépendait selon un produit de convolution temporelle.



Ainsi, les objectifs de cette thèse consistaient à étendre le cadre conceptuel établi par ces auteurs en intégrant non seulement la qualité nutritive du milieu pour évaluer comment celle-ci influence le signal de bioluminescence *au cours du temps*, mais aussi les processus dynamiques qui contrôlent dans le temps et l'espace la répartition des métaux de la solution à la membrane biologique, et ce afin d'évaluer les effets de biodisponibilité/spéciation hors-équilibre et de déplétion des métaux en solution sur la réponse temporelle des biosenseurs.

Ce manuscrit est composé de 4 chapitres. Le **Chapitre 1** correspond à une synthèse bibliographique divisée en trois sous-parties. La première sous-partie présente le fonctionnement de la bioluminescence bactérienne et les différents opérons impliqués. La deuxième présente une synthèse sur les biosenseurs bactériens naturellement bioluminescents et génétiquement modifiés, leurs fonctionnements et leurs constructions. Enfin, la troisième sous-partie est axée sur les méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des métaux. Une attention particulière sera portée sur la définition de ce terme ainsi que sur les méthodes employées pour l'évaluer, tels que les modèles à l'équilibre thermodynamique comme les Biotic Ligand Model (BLM) et Free Ion Activity Model (FIAM), les modèles dynamiques, l'utilisation de biosenseurs bactériens luminescents à détection de métaux et la problématique de décodage de leurs signaux produits au cours du temps. Le **Chapitre 2** présente le matériel et les méthodes mises en place pour répondre aux objectifs de cette thèse. Les **Chapitres 3 et 4** démontrent comment la qualité nutritive du milieu influence le signal temporel de bioluminescence de deux biosenseurs bactériens luminescents, *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductible au Cd(II) et *Escherichia coli rrnB-P1-luxCDABE* marqueur de l'activité métabolique. Plus précisément, le **Chapitre 3** démontre que le couplage de deux mécanismes de régulation globale (*i.e.* la *réponse stringente* et la *répression catabolique*) conduit à l'apparition d'une succession de pics de bioluminescence de formes bien définies au cours du temps. Les signaux de bioluminescence ont été reconstruits avec succès à l'aide d'un modèle théorique récemment publié (**Duval & Pagnout, 2020**). Ce dernier a notamment permis d'évaluer la photoactivité cellulaire en fonction du temps et d'obtenir des informations qualitatives sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux en solution. Les résultats ont clarifié comment la biodisponibilité des métaux/nutriments et la qualité des nutriments contribuent à définir la typologie de la réponse de bioluminescence. Le **Chapitre 4** quant à lui met en évidence que les principes de fonctionnement des biosenseurs spécifiques et non spécifiques à cellules entières ne sont pas exclusifs, car les deux peuvent sonder des modulations similaires de l'activité métabolique dans des conditions de stress/carences nutritives données. Cette similarité révélée par la déconvolution des signaux contraste avec le fait que les signaux des biosenseurs spécifiques et non spécifiques diffèrent significativement en termes de forme, d'amplitude et de nombre de pics selon les conditions nutritionnelles du milieu. L'analyse met en évidence les caractéristiques partagées par leurs profils

respectifs de photoactivité cellulaire tel que médié par le couplage entre *réponse stringente* et *répression catabolique*. Le **Chapitre 5** reporte quant à lui des mesures de bioluminescence dans le temps produite par *E. coli zntA-luxCDABE* dans des conditions contrôlées en concentration en ligands (ou chélateurs) modèles (moléculaires ou particulaires) de Cd et en biosenseurs bactériens. Il est montré, de façon qualitative, que les modulations des signaux des biosenseurs sont en accord avec un formalisme théorique détaillé en **Annexe (p. 166)**. Ce formalisme établit le lien théorique existant entre dépendance temporelle des signaux de bioluminescence, photoactivité cellulaire et spéciation/biodisponibilité des métaux en solution et ce en dépassant le cadre restrictif des modèles à l'équilibre thermodynamique (du type BLM). En particulier, ce formalisme définit explicitement les systèmes et conditions où BLM est applicable ou non. Enfin, une conclusion générale clôture ce manuscrit et présente certaines perspectives et quelques développements futurs qui peuvent être envisagés suite aux résultats décrits dans ce manuscrit de thèse.

---

## *Références bibliographiques*

Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2019). Decoding the Time-Dependent Response of Bioluminescent Metal-Detecting Whole-Cell Bacterial Sensors. *ACS Sensors*, 4(5), 1373-1383.

Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2020). Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters : Experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127751.

Pagnout, C., Présent, R. M., Billard, P., Rotureau, E., & Duval, J. F. L. (2018). What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 270, 482-491.

# *Chapitre 1. Synthèse bibliographique*

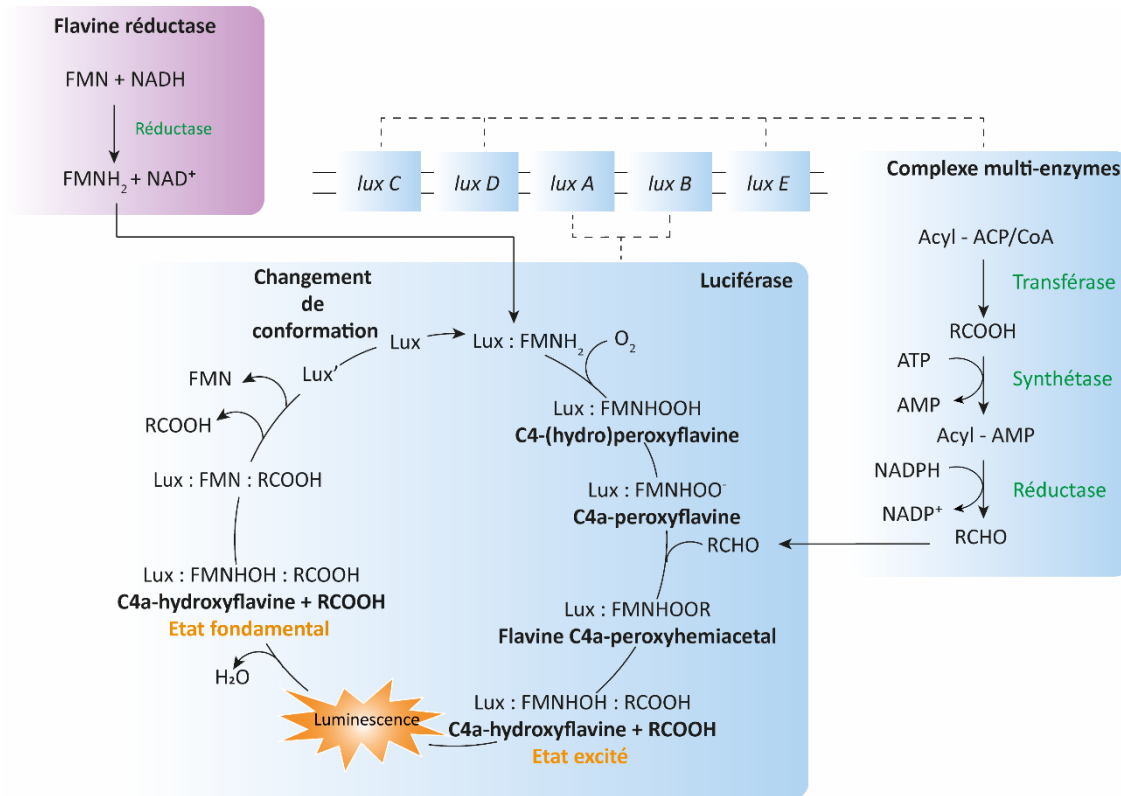
Avec l'augmentation des activités anthropiques et des applications associées dans les domaines de l'industrie, l'agriculture et l'urbanisation, la dissémination des métaux lourds dans les écosystèmes aquatiques suscite de nombreuses inquiétudes quant à leurs effets sur les écosystèmes. Compte tenu de leur persistance, de leur capacité à être bioaccumulés et à induire de potentiels effets toxiques, le besoin d'outils précis et sensibles pour détecter et quantifier ces polluants a conduit au développement de nombreuses méthodes analytiques (*e.g.* ICP-MS/AES, AAS, GC-MS, HPLC-MS) (**Väänänen et al., 2018; Abbas et al., 2018; H. Kim et al., 2020; Muneeswaran et al., 2021**). Pour autant, il est admis que ces méthodes sont coûteuses et complexes à mettre en œuvre. Elles nécessitent généralement un prétraitement de l'échantillon (*e.g.* filtration, acidification), ou une extraction de la matrice environnementale (*e.g.* centrifugation, filtration sous vide), un équipement de pointe et une certaine expertise (**Girotti et al., 2008; Magrisso et al., 2008; Huang et al., 2015; Väänänen et al., 2018; H. Kim et al., 2020**). En outre, ces méthodes ne permettent pas à elles seules, de distinguer la fraction biodisponible des métaux de la quantité totale, laquelle fraction est essentielle pour évaluer la toxicité de l'échantillon (**Magrisso et al., 2008 ; Huang et al., 2015 ; Väänänen et al., 2018 ; Muneeswaran et al., 2021**). Généralement, ces analyses chimiques sont couplées à d'autres outils/méthodes tels que des essais biologiques de toxicité, des échantillonneurs passifs (*e.g.* Diffusive Gradients in Thin films (DGT), Chemcatcher®, Diffusive Milli-Gel (DMG)), des calculs de spéciation de métaux (*e.g.* Visual Minteq) basés sur des modèles de spéciation thermodynamiques (*e.g.* Free Ion Activity Model (FIAM), Equilibrium Partitioning model (EqP), Windermere Humic Aqueous Model (WHAM)) et des modèles thermodynamiques de bioaccumulation (*e.g.* Biotic Ligand Model (BLM)) (**Magrisso et al., 2008 ; Väänänen et al., 2018**), lesquels présentent également leurs propres complexités et/ou limites. Ces dernières décennies, des solutions prometteuses basées sur l'utilisation de biosenseurs bactériens bioluminescents à détection de métaux ont vu le jour. Grâce à leur réactivité, leur sensibilité élevée et leur spécificité, leur coût réduit et leur simplicité d'utilisation, ces organismes unicellulaires offrent une approche rapide et efficace pour évaluer la quantité de métaux perçue (*i.e.* internalisée par la bactérie) et les effets délétères qui en résultent. Ils se révèlent ainsi être des outils analytiques précieux pour estimer la concentration des ions métalliques biodisponibles et détecter rapidement leur toxicité (**Shin, 2011**).

# 1. Bioluminescence bactérienne

## 1.1. Fonctionnement de la bioluminescence bactérienne

La bioluminescence est une source lumineuse émise par des bactéries bioluminescentes omniprésentes dans l'environnement. La plupart d'entre elles sont présentes dans les écosystèmes aquatiques ou terrestres. Ces bactéries appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries sont réparties dans 6 genres bactériens (*Vibrio*, *Candidatus*, *Allivibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* et *Photorhabdus*) (Vannier *et al.*, 2020). La bioluminescence émise par ces bactéries implique une molécule émettrice de lumière, la luciférine. Cette dernière est produite à la suite d'une cascade de réactions chimiques impliquant une monooxygénase, la luciférase bactérienne qui est une protéine hétérodimérique d'environ 80 kDa composée d'une sous-unité  $\alpha$  (40-42 kDa) et  $\beta$  (36-37 kDa), une flavine réductase (23-27 kDa), un complexe multi-enzymes d'acide gras d'environ 500 kDa composé de 4 acyl réductases NADPH-dépendantes (54 kDa x 4), de 4 acyl transférases (33 kDa x 4) et de 4 synthétases ATP-dépendantes (42 kDa x 4), ainsi que différents substrats nécessaires à la réaction, à savoir un mononucléotide à flavine réduite (FMNH), un aldéhyde aliphatique (RCHO) à longue chaîne (C8-C14) et de l'oxygène (O<sub>2</sub>) (Meighen & Dunlap, 1993 ; Brodl *et al.*, 2018).

Brièvement, le FMN est réduit en FMNH<sub>2</sub> par une NADH-dépendante flavine réductase puis transféré et lié au site actif de la luciférase (lux:FMNH<sub>2</sub>). L'oxydation de ce complexe par l'O<sub>2</sub> entraîne la formation d'un composé intermédiaire, le C4a-(hydro)peroxyflavine (lux:FMNHOOH). Ce dernier, subit une déprotonation et forme une C4a-peroxyflavine (lux:FMNHOO-) qui par réaction avec un aldéhyde génère une flavine C4a-peroxyhemiacetal (lux:FMNHOO-R). Un clivage de la liaison O-O entraîne la production d'un acide carboxylique (RCOOH) et de la C4a-hydroxyflavine (lux:FMNHOOH). Cette dernière, qualifiée de luciférine, émet de la lumière ( $\lambda_{490\text{ nm}}$ ) lors du passage d'un état excité à un état fondamental. Cette émission de luminescence est suivie par une déshydratation de la molécule permettant la libération du FMN oxydé et de l'acide carboxylique, et un retour à une luciférase libre. L'aldéhyde intervenant dans cette réaction provient du complexe multi-enzymes. Un acide gras libre est tout d'abord généré par la transférase à partir de l'acyl-ACP ou de l'acyl-CoA, puis transféré au niveau de la synthétase. Cette dernière va activer thermodynamiquement l'acide gras libre en acyl-AMP à partir de l'ATP. L'acyl-AMP est ensuite transféré à la réductase et se trouve réduit en aldéhyde par l'action du NADPH (Brodl *et al.*, 2018; Nijvipakul *et al.*, 2008; Tinikul *et al.*, 2020) (Fig. 1). Les gènes codant pour les protéines impliquées dans la réaction de bioluminescence sont décrits ci-dessous.

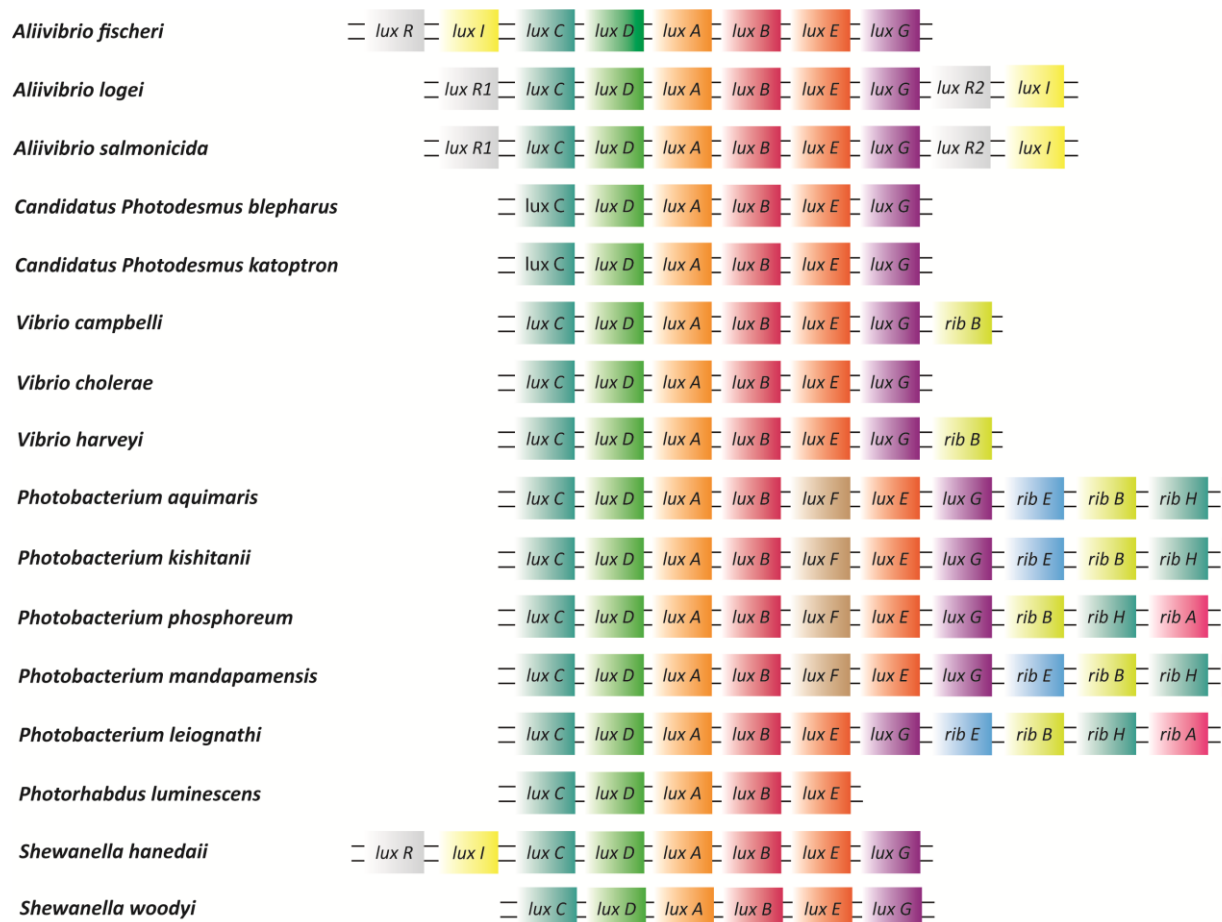


**Fig. 1** : Mécanisme général de la réaction de bioluminescence bactérienne (d'après Tinikul et al., 2020, modifié).

## 1.2. Opérons impliqués dans la réaction de bioluminescence

La bioluminescence bactérienne est contrôlée par un opéron *lux* comprenant généralement 5 gènes dénommés *luxCDABE*. Les gènes *luxA* et *luxB* codent respectivement pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase bactérienne tandis que les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent respectivement une réductase, une transférase et une synthétase s'associant entre elles pour former un complexe multi-enzymes (Meighen, 1993). L'opéron *lux* comporte généralement un 6<sup>ème</sup> gène, le gène *luxG* codant pour une flavine réductase NAD(P)H-dépendante qui convertit la flavine libre (FMN) en flavine réduite (FMNH<sub>2</sub>) (Nijvipakul et al., 2008). Retrouvé en aval du gène *luxE*, le gène *luxG* est présent dans toutes les bactéries bioluminescentes aquatiques connues à ce jour, mais absent chez la bactérie terrestre *Photorhabdus luminescens* supposant une fonction spécifique à l'environnement marin (Meighen, 1991 ; Meighen & Dunlap, 1993). Des variations mineures peuvent également être observées chez certaines souches bactériennes, notamment au sein du genre *Photobacterium* avec la présence de gènes supplémentaires dans l'opéron, tels que *luxF*, et *ribEBHA*. Situé entre les gènes *luxB* et *luxE*, le gène *luxF* code pour une protéine LuxF qui atténue l'inhibition de la luciférase par un sous-produit issu de la réaction de bioluminescence, le 6-(30-(R)-myristyl) flavine adénine mononucléotide (myrFMN) (Tabib et al., 2017). Au sein du genre *Photobacterium*, les gènes *ribEBHA* sont presque exclusivement

retrouvés en aval de l'opéron *luxCDAB(F)EG*, à l'exception de *ribB* présent également chez quelques espèces du genre *Vibrio*. Ces gènes sont impliqués dans la synthèse de la riboflavine, composant majeur du FMN (Lin et al., 2001). Chez certaines bactéries lumineuses, la production de lumière est régulée par le quorum-sensing, un mécanisme dépendant de la densité cellulaire. Ce mécanisme, implique 2 gènes, *luxI* et *luxR* qui peuvent être présents en amont ou en aval de l'opéron (Dunlap, 2009 ; Brodl et al, 2018 ; Vannier et al, 2020) (Fig. 2).



**Fig. 2 :** Diversité des opérons *lux* chez les bactéries bioluminescentes. Les opérons sont alignés pour mettre en évidence les points communs et les différences dans l'organisation des gènes (d'après Dunlap, 2009 et Vannier et al, 2020).



## 2. Biosenseurs bactériens bioluminescents

Les biosenseurs bactériens bioluminescents peuvent être définis comme des micro-organismes capables de générer un signal mesurable (*i.e.* bioluminescence) à la suite de l'expression de gènes rapporteurs *lux* (luciférase bactérienne) en réponse à un stress général, à un stress donné (*e.g.* dommage à l'ADN, membrane, protéines) ou à un analyte cible (*e.g.* un ion métallique biodisponible) (**Sørensen et al., 2006**). Au cours des dernières décennies, nombre d'entre eux ont été développés pour évaluer la concentration et/ou la biodisponibilité de certains métaux dans l'environnement. Les biosenseurs bactériens peuvent être classés en deux grandes catégories : les naturellement bioluminescents qui sont majoritairement utilisés dans l'évaluation de la toxicité et les génétiquement modifiés, plus spécifiques et qui sont davantage utilisés dans la détection/quantification d'analytes.

### 2.1. Utilisation des biosenseurs naturellement bioluminescents pour la surveillance de l'environnement

L'utilisation de bactéries naturellement bioluminescentes (*i.e.* *Photobacterium phosphoreum*) pour évaluer la toxicité d'un échantillon environnemental a été décrite pour la première fois dans les années 1960 par **Serat et al., (1965, 1967, 1969)**. Exposés à des polluants photochimiques produits par irradiation du cis-2-butène et du monoxyde d'azote (NO), les biosenseurs ont rapporté une diminution de l'intensité lumineuse proportionnelle à la concentration et à la vitesse de formation du produit photochimique connu (**Serat et al., 1969**). L'utilisation de la bioluminescence comme proxy pour sonder la toxicité engendrée par les polluants a ensuite été adoptée dans de nombreuses études, et ce pour une grande diversité de polluants (*e.g.* hydrocarbures aromatiques polycycliques, nanoparticules, pesticides, produits pharmaceutiques, métaux lourds, herbicides), de matrices environnementales (*e.g.* eau, sol, sédiment) et de bactéries dont *Aliivibrio logei*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium asymbiotica*, *Photobacterium luminescens* (anciennement connu sous le nom de *Xenorhabdus luminescens*), *Vibrio harveyi*, *Vibrio qinghaiensis* ou encore *Aliivibrio fischeri* (initialement classée comme *Photobacterium phosphoreum* et *Vibrio fischeri*) (**Hurtado-Gallego et al., 2019**) (**Tableau I**). Cette dernière a fait l'objet de nombreuses études, notamment l'espèce *Aliivibrio fischeri* NRRL B-11177 connue pour son utilisation dans le test normalisé Microtox™ (Microbics Corporation ; Carlsbad, USA). Ce dernier s'est largement imposé dans le domaine de l'écotoxicologie et a motivé la création de nombreux autres tests commerciaux tels que ToxAlert® (Merck, Allemagne), BioTox™ (Aboatox, Finlande), ToxScreen3 (CheckLight Ltd., Israël), LUMISTox™ (Hach Lange, États-Unis) ou encore LumiMARA (NCIMB, Royaume-Uni) (**Abbas et al., 2018 ; Hurtado-Gallego et al., 2019**).

**Tableau I :** Travaux effectués sur les bactéries naturellement bioluminescentes entre 1985 et 2021 (d'après Hurtado-Gallego et al., (2019), modifié).

Micro-organismes	Tests commerciaux	Applications environnementales	Polluants testés	Références
<i>Aliivibrio fischeri</i> (plusieurs souches)	Microtox M500, Microtox, Microtox M500, ToxAlert® 10	Eaux (douces, souterraines, marines, usées) sédiments, sols	Nanomatériaux, métaux lourds, composés organostanniques, hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, pesticides, produits pharmaceutiques, plastifiants, surfactants, antibiotiques, substances organiques hydrophobes, colorants azoïques, herbicides.	Nohava et al., (1995) Salizzato et al., (1998a) Salizzato, et al., (1998b) Bispo et al., (1999) Muneer et al., (1999) el-Alawi et al., (2001) Farré et al., (2001) Pérez et al., (2001) Dzyadevych & Chovelon, (2002) Osano et al., (2002) Papadopoulou & Samara, (2002) Wang et al., (2002) Zabetoglou et al., (2002) Farré & Barceló, (2003) Hsieh et al., (2004) Kungolos et al., (2004) Neamtu et al., (2004) Ma et al., (2005) Aichberger et al., (2006) Wolska et al., (2006) Hernando et al., (2007) Hirmann et al., (2007) Katsoyiannis & Samara, (2007) Farré et al., (2008) Heinlaan et al., (2008) Jurado et al., (2008) Li et al., (2008)

Micro-organismes	Tests commerciaux	Applications environnementales	Polluants testés	Références
				Mortimer et al., (2008) Ocampo-Duque et al., (2008) Velzeboer et al., (2008) Corrêa et al., (2010) Ellouze et al., (2009) Saddoud et al., (2009) Strigul et al., (2009) Gouider et al., (2010) Somensi et al., (2010) Pereira et al., (2011) Nuzzo et al., (2017) Sajayan et al., (2017) Svartz et al., (2017) Tsiridis et al., (2017) Ríos et al., (2018) Mirjani et al., (2021)
<i>Aliivibrio logei</i>		Eaux usées industrielles, eaux de mer	Métaux lourds, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides	Fernández-Piñas et al., (2014)
<i>Vibrio harveyi</i>	LumiMARA		Métaux lourds, nanomatériaux	Jung et al., (2015)
<i>Photobacterium leiognathi</i>	LumiMARA, ToxScreen	Microtox, Eaux douces	Métaux lourds, nanomatériaux, hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, pesticides	Fernández-Piñas et al., (2014) Jung et al., (2015)
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (plusieurs souches)	Microtox, LUMISTox, Microbiosensor 677F	LumiMARA, 300, B17-	Métaux lourds, nanomatériaux, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides	Hermens et al., (1985) Brouwer et al., (1990) Kahru et al., (1996) McConkey et al., (1997) Barrena et al., (2009) Hassan & Oh, (2010)

Micro-organismes	Tests commerciaux	Applications environnementales	Polluants testés	Références
				Fernández-Piñas et al., (2014) Jung et al., (2015) Deryabin et al., (2016) Fekete-Kertész et al., (2017) Wang et al., (2017)
<i>Photorhabdus asymbiotica</i>	LumiMARA		Nanomatériaux	Jung et al., (2015)
<i>Photorhabdus luminescens</i>	LumiMARA	Eaux usées	Métaux lourds, nanomatériaux	Schmitz et al., (1999) Jung et al., (2015)
<i>Vibrio qinghaiensis sp. Q67</i>		Eaux potables, eaux douces	Métaux lourds, pesticides	Fernández-Piñas et al., (2014) Zhang & Chen, (2014) Ding et al., (2017) Mo et al., (2017) Wang et al., (2017)

Pour autant, en raison de l'origine marine des bactéries employées dans ces kits, des questions se sont posées quant à la pertinence de leurs applications dans les environnements d'eau douce et terrestre. En effet, l'ajout de sel dans les échantillons (2-3 % NaCl) pour obtenir une bioluminescence optimale peut influencer le mode d'action ou la liaison aux cellules de certaines substances (*e.g.* chlorophénols) et la spéciation des métaux (Sinclair et al., 1999 ; Deheyn et al., 2004), biaisant de ce fait les résultats de toxicité obtenus. C'est la raison pour laquelle des souches naturellement bioluminescentes de ces environnements (*i.e.* *Vibrio qinghaiensis* et *Photobacterium luminescens*) ont été proposées comme micro-organismes alternatifs et ont montré leurs applicabilités dans le monitoring environnemental (Ye et al., 2011 ; Masner et al., 2017). En outre, ces kits commerciaux (*e.g.* Microtox™) ne fonctionnent que dans une certaine gamme de température (*i.e.* 15–17°C) qui peut être trop restreinte pour une utilisation *in situ*. C'est particulièrement vrai pour les environnements côtiers indiens et plus généralement pour les environnements tropicaux qui présentent des températures bien supérieures aux températures d'utilisation optimales des kits. Ce constat a été mentionné dans l'étude de Muneeswaran et al., (2021), les incitant de ce fait à isoler et identifier une espèce luminescente indigène présentant une large gamme de tolérance à la température (*i.e.* *Photobacterium leiognathi* extrait du poisson luminescent *Gazza minuta*) pour évaluer la toxicité des métaux lourds. Certaines études ont également mentionné une gamme de pH trop restreinte (*i.e.* 6.5–7.5). C'est notamment le cas pour les essais *in vitro* effectués par Sinclair et al., (1999) pour évaluer les effets du pH sur la sorption microbienne et la toxicité des chlorophénols par des biosenseurs bioluminescents. Essais qui ont démontré l'inadaptabilité du test Microtox™ à cette étude en raison de la plage de pH trop restreinte.

Pour remédier à ces problématiques, mais également pour disposer d'organismes de résistances et de sensibilités diverses, des biosenseurs bioluminescents génétiquement modifiés ont été développés.

## 2.2. Utilisation des biosenseurs bioluminescents génétiquement modifiés pour la surveillance de l'environnement

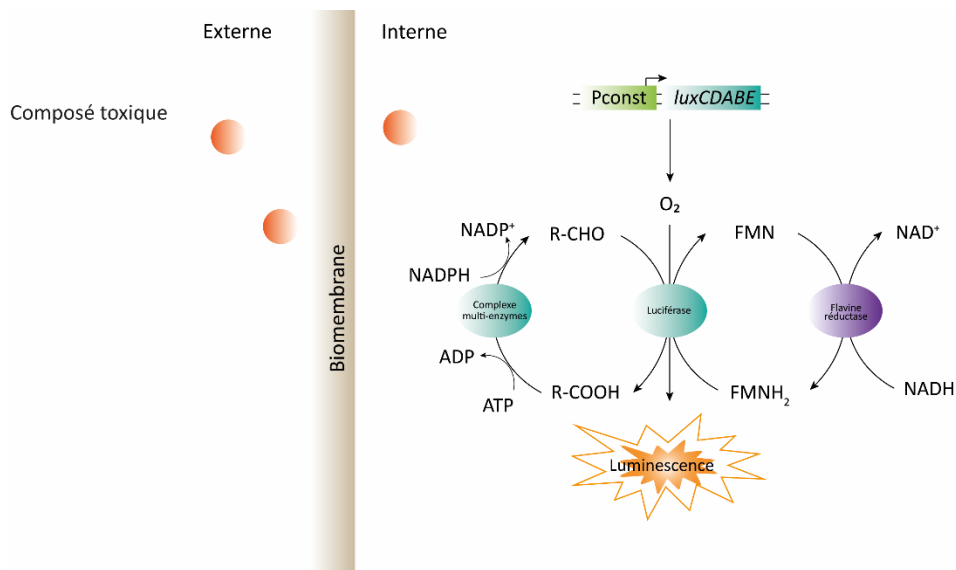
Le développement des micro-organismes génétiquement modifiés comportant au sein de leur génome des gènes *lux* étrangers provenant de bactéries bioluminescentes (*i.e.* *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* ou *Photobacterium luminescens*) a été initié fin des années 1980. Le couplage des gènes *lux* à des promoteurs constitutifs ou inductifs (impliqués dans des stratégies d'homéostasie/résistance/réparation) a permis d'évaluer la toxicité d'échantillons provenant d'environnements très variés, mais également de mettre en évidence un mécanisme de stress et/ou de défense ou la présence d'un composé spécifique (Shin, 2011).

Le développement de tels biosenseurs impliquent de définir un certain nombre de paramètres comme récemment décrit par Bazhenov et al., (2023). Tout d'abord, il convient de définir le champ

d'application, autrement dit le champ d'étude dans lequel le biosenseur sera utilisé. Par exemple la détection d'un composé spécifique ou d'un effet toxique général ou spécifique dans un environnement préalablement défini (*e.g.* eaux douces, eaux marines, sédiments, sols, eaux usées). Il convient également de définir la souche hôte et le système de régulation approprié en fonction du champ d'application. La souche hôte doit pouvoir répondre de manière optimale dans les conditions de l'environnement sélectionné (*e.g.* pH, température, salinité) et avoir un système de régulation adapté et suffisamment sensible pour répondre à une toxicité générale ou spécifique, ou à la présence d'un composé cible (**Kessenikh et al., 2021**). Dans le cas contraire, il est possible d'extraire le système de régulation d'une autre bactérie plus sensible et de l'intégrer dans la souche hôte (*e.g.* système LuxI/LuxR (Quorum Sensing) de *Aliivibrio fischeri* fusionné aux gènes *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* et intégré dans *E. coli*) (**Bazhenov et al., 2021**). Le gène rapporteur a lui aussi son importance. Des études ont démontré que les luciférases bactériennes pouvaient se différencier par leur sensibilité, thermostabilité et cinétique de renouvellement. A titre illustratif, la cinétique de renouvellement de la luciférase d'*Aliivibrio fischeri* (*i.e.* 100 ms) est plus rapide que celle de *Photobacterium luminescens* (*i.e.* 2 s). Toutefois, la luciférase de *Photobacterium luminescens* peut fonctionner à des températures plus importantes (*i.e.* 45 °C) contrairement à celle d'*Aliivibrio fischeri* qui est inactivée à partir de 32 °C (**Szittner & Meighen, 1990 ; Winson et al., 1998 ; Bazhenov et al., 2023**). Enfin, il convient de choisir la méthode d'insertion. Une approche consiste à remplacer un gène spécifiquement inductible par les gènes rapporteurs *lux* dans l'ADN chromosomique (**Elsemore, 1998 ; Ivask et al., 2009**), tandis que l'autre méthode consiste en une fusion transcriptionnelle des gènes *lux* avec un promoteur dans un plasmide, puis à introduire cette construction dans les cellules de la souche hôte (**Van Dyk & Rosson, 1998 ; Ivask et al., 2009**). Cette dernière approche est la plus communément utilisée en raison d'une sensibilité plus élevée (**Ivask et al., 2009**). Cela s'explique par le fait que, sur un chromosome, le niveau de production d'enzymes est généralement faible. En revanche, sur un plasmide, qui peut exister en plusieurs copies dans une cellule, la production d'enzyme est naturellement plus importante et conduit donc à une réaction et une sensibilité plus élevée.

Ainsi, en fonction de leur construction et plus particulièrement du système de régulation sélectionné (*i.e.* promoteur), les biosenseurs bioluminescents génétiquement modifiés peuvent être divisés en trois catégories :

- (i) **Non spécifiques** (cellules constitutivement luminescentes ; les gènes *lux* sont sous le contrôle d'un promoteur exprimé de manière constitutive en lien avec l'activité métabolique de la souche) (**Fig. 3**). Ces biosenseurs présentent un fonctionnement similaire aux bactéries naturellement bioluminescentes. Ils présentent une diminution de la bioluminescence à la suite d'une perturbation de l'activité métabolique cellulaire induite par des effets délétères causés par un toxique ou un mélange de toxiques (**Sørensen et al., 2006**). Le **tableau II** présente un résumé des biosenseurs bactériens génétiquement modifiés non spécifiques développés pour évaluer la toxicité environnementale.



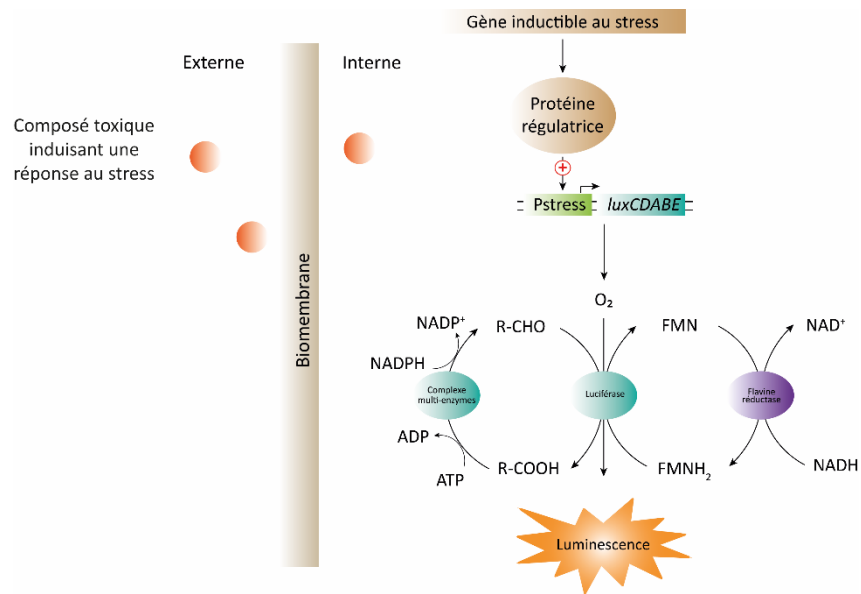
**Fig. 3** : Fonctionnement global d'un biosenseur bactérien non spécifique. Le gène rapporteur est fusionné à un promoteur constitutif (*Pconst*) et la toxicité est quantifiée par la diminution de la luminescence émise (d'après Sørensen et al., 2006, modifié).

**Tableau II** : Construction de biosenseurs non spécifiques

<b>Micro-organisme</b>	<b>Construction</b>	<b>Stress général</b>	<b>Références</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>lysS-luxCDABE</i>	Viabilité cellulaire	Shah & Naseby, (2014)
	<i>spc-luxCDABE</i>	Viabilité cellulaire	Shah & Naseby, (2014)
	<i>lpp-luxCDABE</i>	Viabilité cellulaire	Shah & Naseby, (2014)
	<i>tatA-luxCDABE</i>	Viabilité cellulaire	Shah & Naseby, (2014)
	<i>ldcC-luxCDABE</i>	Viabilité cellulaire	Shah & Naseby, (2014)
Cyanobactérie	<i>cpc-luxCDABE</i>	Activité photosynthétique	Till et al., (2020)
	<i>psbA-luxCDABE</i>	Activité photosynthétique	Till et al., (2020)



(ii) **Semi-spécifiques ou spécifiques au stress** (cellules luminescentes inductibles ; les gènes *lux* sont sous le contrôle du promoteur activé dans des conditions de stress spécifiques) (**Fig. 4**). Ces biosenseurs produisent un signal de bioluminescence en réponse à des produits chimiques nocifs et/ou à des conditions de milieu stressantes lors de l'activation de mécanismes de défense contre le stress produit. Dans ce cas, l'expression des gènes *lux* est déclenchée par un promoteur qui est activé par des protéines régulatrices liées à la réponse au stress. Il est donc possible de déterminer des dommages causés à l'ADN, aux protéines ou aux lipides de la membrane, ou encore la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Sørensen et al., 2006**). Les dommages subis par l'ADN peuvent être appréhendés à travers deux mécanismes distincts de réparation : d'une part, la réponse adaptative à l'alkylation, régulée par le gène *ada*, et d'autre part, la réponse SOS, déclenchée en cas de lésions à l'ADN ou d'inhibition de sa synthèse, mobilisant ainsi une série de gènes *e.g.* *recA*, *lexA*, *uvrA* et *umuDC* (**Vollmer et al., 1997**). Les dommages causés aux protéines ou aux lipides membranaires sont quant à eux généralement évalués en observant l'arrêt de la synthèse des acides gras. Ce processus active le gène *fabA*, lequel code pour une enzyme impliquée dans la synthèse de ces acides gras (**Belkin et al., 1997**). Enfin, la réponse au stress oxydatif induite par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut être évaluée à l'aide de OxyR qui induit l'expression de plusieurs gènes comme *katG* (catalase), *oxyS* (ARN régulateur), *gorA* (glutathion réductase) ou du système SoxRS (**Kotova et al., 2010**). Ce dernier active l'expression d'un éventail de gènes, incluant *sodA* (superoxyde dismutase au manganèse), *nfo* (endonucléase IV impliquée dans la réparation de l'ADN), *zwf* (déshydrogénase du glucose-6-phosphate), *acnA* (aconitase), *fumC* (fumarase), *fpr* (ferrédoxine réductase), *acrAB* (pompes à efflux), *micF* (ARN antisens de la porine ompF) et *fur* (répresseur du transport du fer) (**Kotova et al., 2010 ; Woutersen et al., 2011**). Le **tableau III** répertorie des exemples de biosenseurs bactériens bioluminescents développés pour évaluer la réponse à un stress spécifique.



**Fig. 4** : Fonctionnement d'un biosenseur semi-spécifique. La toxicité est mesurée par une augmentation de la production de la luminescence induite par l'activation du promoteur (Pstress), en réponse à un stress spécifique (d'après Sørensen *et al.*, 2006, modifié).

Tableau III : Construction de biosenseurs bactériens semi-spécifiques

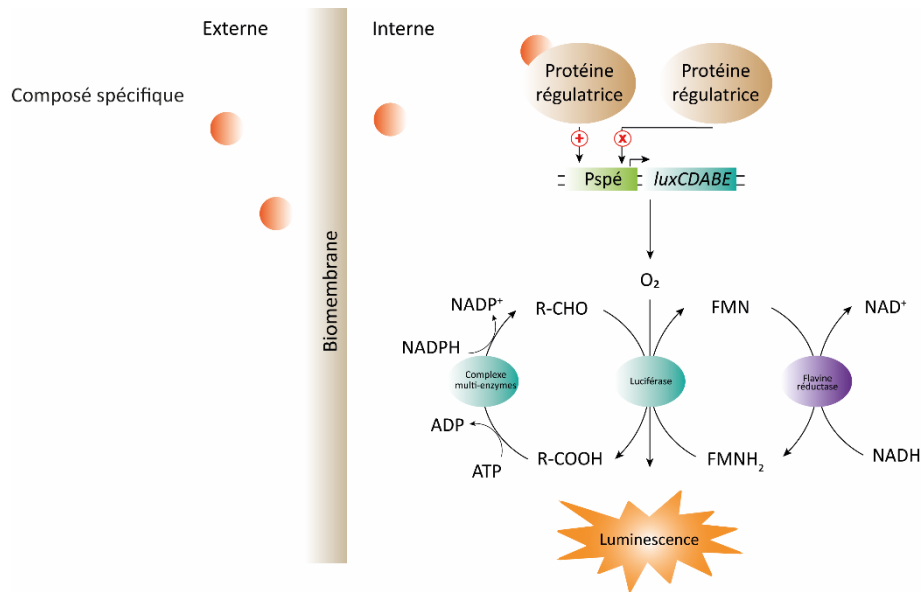
Micro-organisme	Construction	Stress ciblé	Références
<i>Escherichia coli</i>	<i>recA-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN (réponse SOS)	Vollmer et al., (1997) Ahn et al., (2009) Kotova et al., (2010)
	<i>cda-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN (réponse SOS)	Kotova et al., (2010)
	<i>dinI-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN (réponse SOS)	Ahn et al., (2009)
	<i>sulA-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN (réponse SOS)	Ahn et al., (2009)
	<i>nrdA-luxCDABE</i>	Dommmage à l'ADN	Hwang et al., (2008) Ahn et al., (2009)
	<i>dnaK-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN	Dyk et al., (1994)
	<i>sbmC-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN	Ahn et al., (2009)
	<i>recN-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN	Ahn et al., (2009)
	<i>alkA-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN	Vollmer et al., (1997) Ahn et al., (2009)
	<i>micF-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Ben-Israel et al., (1998)
	<i>soxS-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Kotova et al., (2010)
	<i>sodA-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Ivask et al., (2010)
	<i>katG-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Belkin et al., (1997) Kotova et al., (2010)
	<i>fpr-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Niazi et al., (2007)
	<i>zwf-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Niazi et al., (2007)
	<i>grpE-luxCDABE</i>	Dommmages aux protéines, (Heat shock)	Dyk et al., (1994)

---

Micro-organisme	Construction	Stress ciblé	Références
<i>Escherichia coli</i>	<i>ibpA-luxCDABE</i>	Dommmages aux protéines, (Heat shock)	Van Dyk et al., (1995)
	<i>fabA-luxCDABE</i>	Dommmages à la membrane	Kotova et al., (2010)
			Belkin et al., (1997)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>dinC-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN (réponse SOS)	Bechor et al., (2002)
	<i>mrgA-luxCDABE</i>	Dommmages à l'ADN	Kessenikh et al., (2021)
	<i>alkA-luxCDABE</i>	Stress oxydant	Kessenikh et al., (2021)

---

- (iii) **Spécifiques** (cellules luminescentes inductibles ; les gènes *lux* sont sous le contrôle du promoteur activé en réponse à la présence d'un analyte cible) (**Fig. 5**). Ces biosenseurs produisent un signal de bioluminescence en réponse à des composés cibles lors de l'activation d'un mécanisme d'homéostasie ou de résistance contre ce même composé (ou composé analogue *e.g.* Zn et Cd pour le promoteur pZntA). L'expression de l'opéron *lux* est donc induite suite à l'activation d'un promoteur par une protéine régulatrice impliquée dans ce mécanisme (**Tableau IV**).



**Fig. 5** : Fonctionnement d'un biosenseur spécifique. Un composé spécifique est détecté par des mécanismes impliqués dans l'homéostasie ou la résistance au composé cible. Ces mécanismes utilisent généralement des protéines régulatrices jouant le rôle d'activateur transcriptionnel. En présence d'un composé spécifique, les protéines régulatrices vont se lier avec le composé cible et activer le promoteur (Pspé) induisant l'expression des gènes *lux*. La réponse se traduit par une augmentation mesurable de la production de la protéine rapporteuse (luciférase) et de la luminescence. En l'absence du composé cible, la protéine régulatrice réprime la transcription des gènes *lux* en se fixant au promoteur (d'après Sørensen et al., 2006, modifié).

**Tableau IV** : Construction de biosenseurs bactériens spécifiques

Micro-organisme	Construction	Analyte cible	Références	
<i>Escherichia coli</i>	<i>alkB-luxAB</i>	C6-C10 alcane	Sticher et al., (1997)	
	<i>ars-luxAB</i>	As	Stocker et al., (2003) Charrier et al., (2011)	
	<i>tbuT-luxAB</i>	BTEX	Tecon et al., (2010)	
	<i>ars-luxCDABE</i>	As	Ivask et al., (2007)	
	<i>copA-luxCDABE</i>	Cu, Ag	Riether et al., (2001) Ivask et al., (2009) Ivask et al., (2010)	
	<i>mer-luxCDABE</i>	Hg	Ivask et al., (2007) Sciuto et al., (2019) Trang et al. (2005) Ivask et al., (2009)	
	<i>zntA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	Riether et al., (2001) Ivask et al., (2009) Ivask et al., (2010)	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>nahG-luxCDABE</i>	Naphtalène	King et al., (1990)
		<i>mer-luxCDABE</i>	Hg	Ivask et al., (2009)
		<i>copA-luxCDABE</i>	Cu	Ivask et al., (2009)
<i>zntA-luxCDABE</i>		Cd, Pb, Zn, Hg	Ivask et al., (2009)	
<i>pbrA-luxCDABE</i>		Pb	Ivask et al., (2009)	
<i>cadA-luxCDABE</i>		Cd	Ivask et al., (2009)	
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>tod-luxCDABE</i>	BTEX	Applegate et al., (1998)	
	<i>cadA-luxCDABE</i>	Zn	Hynninen et al., (2010)	
	<i>czc-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn	Hynninen et al., (2010)	
	<i>pupA-luxCDABE</i>	Fe	Khang et al., (1997)	

---

<b>Micro-organisme</b>	<b>Construction</b>	<b>Analyte cible</b>	<b>Références</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>cadA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	Ivask et al., (2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>cadA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	Ivask et al., (2009)
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>cnr-luxCDABE</i>	Ni, Co	Tibazarwa et al., (2001)

---

### 3. Evaluation de la spéciation/biodisponibilité des métaux

Dans les systèmes environnementaux, les métaux sont présents généralement sous plusieurs formes physicochimiques ou espèces chimiques, incluant des ions métalliques libres (hydratés) (M) et des complexes (ML) formés avec des molécules ou des particules colloïdales biotiques ou abiotiques (*e.g.* les acides humiques et les microorganismes). (Buffle, 1988 ; Slaveykova et al., 2005 ; Zhao et al., 2016). Ces différentes formes regroupées sous le terme « spéciation chimique » ou « distribution chimique » du métal diffèrent par leur taille, forme, structure, densité de charges, charge portée, densité de sites réactifs et perméabilité hydrodynamique, lesquelles influencent leur réactivité chimique, leur mobilité et leur disponibilité pour les organismes (Pinheiro et al., 2004 ; Duval et al., 2008). C'est pourquoi, la prise en compte de ces paramètres est nécessaire dans l'évaluation de la spéciation et de la biodisponibilité des métaux. Ces dernières décennies, plusieurs modèles thermodynamiques ont été développés pour évaluer la biodisponibilité des métaux dans les systèmes environnementaux, notamment le modèle d'activité des ions libres (FIAM pour Free Ion Activity Model, employé dans les modélisations de spéciation de métaux du type WHAM ou NICA-DONNAN) et le modèle des ligands biotiques (BLM pour Biotic Ligand Model). Cependant, ces modèles présentent une limitation en ce sens qu'ils considèrent que la fraction métallique biodisponible s'identifie uniquement aux métaux non complexés en solution (l'argument exclut ici le cas de microorganismes pouvant bioaccumuler des complexes métalliques). De ce fait, ces modélisations à l'équilibre ne prennent pas en compte, entre autres processus, le rôle des complexes suffisamment labiles qui peuvent de par leur dissociation rapide au voisinage des interfaces bioaccumulatrices, contribuer au flux de métaux libres internalisables. Ainsi, ci-dessous, nous passons brièvement en revue la notion de biodisponibilité de métaux telle qu'elle est perçue dans la littérature, en particulier selon les communautés scientifiques, en nous attardant sur la dimension dynamique (temporelle) que le concept de biodisponibilité revêt par nature.

#### 3.1. Qu'est-ce que la biodisponibilité ?

La biodisponibilité est un terme pour lequel il est difficile de formuler une définition simple et générique (Harmsen, 2007). Développée initialement en pharmacologie/toxicologie pour décrire la disponibilité systémique d'une substance étrangère après son administration, la définition de ce terme ainsi que sa méthode d'évaluation ont été revues selon les organismes (*e.g.* plantes, micro-organismes, organismes supérieurs) et les disciplines scientifiques (*e.g.* physico-chimie, biologie, toxicologie) (Harmsen, 2007; Naidu et al., 2008; Kumpiene et al., 2017). Harmsen, 2007 et Kim et al., 2015 ont passé en revue un certain nombre de ces définitions. A titre d'exemple, la biodisponibilité du métal est souvent définie comme (i) un processus de désorption influencé par les propriétés physicochimiques de l'environnement, lesquels déterminent la fraction métallique potentiellement et réellement disponible (disponibilité environnementale ou chimique), (ii) un processus d'absorption influencé par la



physiologie de l'organisme et au cours duquel les fractions de métaux chimiquement disponibles sont accumulées par les organismes (biodisponibilité environnementale ou disponibilité biologique) ou encore (iii) une toxicité potentielle issue de la répartition au sein de l'organisme (biodisponibilité toxicologique), ce dernier point étant inhérent au processus d'absorption (point (ii)) (Peijnenburg et al., 1997; Peijnenburg & Jager, 2003). En outre, Peijnenburg et al., 1997 ; Peijnenburg & Jager, (2003) et d'autres Hund-Rinke & Kördel, (2003) ; Katayama et al., (2010) ; Lanno et al., (2004) ont suggéré de percevoir la biodisponibilité comme un processus dynamique en 3 phases alliant les processus de désorption, d'absorption et de toxicité susmentionnées, tandis que Caussy et al., (2003) et Gochfeld, (2003) établissent clairement une distinction entre la capacité des métaux à être dissous et libérés de la matrice environnementale (biodisponibilité externe) et la capacité des métaux à être absorbés et à exercer des effets néfastes ultérieurs (biodisponibilité interne). Certains auteurs tels que Peijnenburg & Jager, (2003) et Semple et al., (2004) introduisent le concept de "bioaccessibilité" en tant que synonyme de "biodisponibilité externe" ou "disponibilité environnementale ou chimique" évoqué précédemment, et soulignent l'importance de faire une distinction entre les termes "bioaccessibilité" et "biodisponibilité", qui correspondent respectivement à (i) la fraction métallique potentiellement et réellement accessible et (ii) aux fractions de métaux chimiquement accessibles, accumulées par les organismes et pouvant conduire à des effets toxiques ultérieurs.

Dans ce manuscrit, la définition de la biodisponibilité s'apparente à celle de van Leeuwen, (1999) ; van Leeuwen et al., (2005) qui la considère comme étant la fraction de métal libre et issue de la dissociation de complexes qui peut être adsorbée et/ou internalisée par un organisme dans une gamme de temps donnée suite à son transport par diffusion ou conduction du milieu vers la biomembrane. Cette définition nécessite la prise en compte de processus dynamiques qui seront discutés dans la partie 3 de ce chapitre.

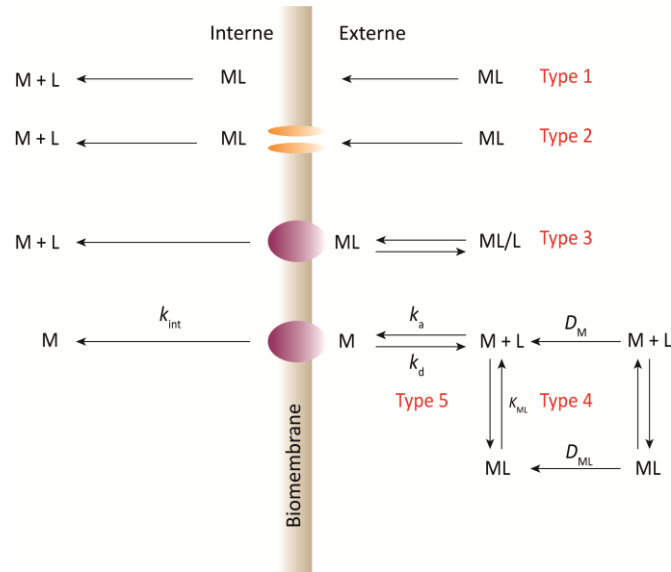
### *3.2. Modèles à l'équilibre thermodynamique*

Au cours de ces dernières décennies, de nombreuses études ont montré que la toxicité d'un métal vis-à-vis d'un organisme est davantage corrélée à sa fraction biodisponible plutôt qu'à sa concentration totale (Zhao et al., 2016). Cependant, la relation entre la biodisponibilité et la spéciation des métaux demeure complexe et difficile à établir dans la plupart des conditions. Nombre d'études ont fait appel à des modèles à l'équilibre thermodynamique tels que le Free Ion Activity Model (FIAM) Morel, (1983) ou Biotic Ligand Model (BLM) Di Toro et al., (2001), pour tenter d'établir cette corrélation. Bien que ces modèles reposent sur la mesure de paramètres différents, à savoir, l'activité de l'ion libre en solution (FIAM) et du métal adsorbé sur des sites sensibles à la surface biologique (BLM) il s'agit dans les deux cas de modèles reposant sur « des hypothèses et un cadre conceptuel similaire » (Hassler et al., 2004).

Ces modèles considèrent entre autres aspects, que (i) l'interaction des métaux avec les organismes se produit principalement au niveau de la membrane plasmique et qu'aucune modification de cette dernière n'est supposée se produire, (ii) la liaison aux sites de surface n'induit aucune régulation biologique significative, (iii) les sites de surface menant à l'internalisation (sites actifs) restent insaturés, (iv) la vitesse d'internalisation du métal est proportionnelle à la concentration de métal libre dans la solution environnante ou à la concentration des complexes formés entre le métal et les sites de surface, (v) la surface membranaire est chimiquement homogène, et (vi) un état d'équilibre est établi entre les espèces métalliques (libres et complexées) en solution et celles liées à la surface biologique (**Hassler et al., 2004 ; Slaveykova et al., 2005**).

Bien que ces modèles soient couramment utilisés, et ce, dans tous types de milieux (*i.e.* complexant ou non complexant), certaines études (**Hassler et al., 2004 ; Slaveykova et al., 2005 ; Zhao et al., 2016**) ont signalé des exceptions pour lesquelles les hypothèses susmentionnées ne sont pas satisfaites ou ne pourraient pas l'être. A titre illustratif, les hypothèses (i) et (ii) stipulent qu'aucune modification de la membrane (*e.g.* altération de la perméabilité membranaire, synthèse et dégradation de protéines de transport) ainsi qu'aucune régulation biologique significative (*i.e.* mécanisme de défense) ne sont supposées se produire. Ces assertions restent pertinentes principalement pour des expositions à suffisamment court terme, les systèmes de régulation et les modifications de la membrane pouvant apparaître à des temps supérieurs. Toutefois, il est important de noter que certains organismes tels que *Listeria monocytogenes* sont capables de répondre à un stress osmotique au bout de seulement 2 minutes (**Jørgensen et al., 1995**). De la même manière, l'hypothèse (iv) qui associe la vitesse d'internalisation des métaux à la concentration de métaux libres dans la solution environnante reste valable uniquement lorsque les sites de surface demeurent insaturés (hypothèse (iii)). L'hypothèse (v) concernant l'homogénéité chimique de la membrane se révèle être extrêmement simplifiée puisqu'elle ne tient compte que des sites de surface conduisant à l'internalisation (sites actifs). Elle omet l'existence des autres sites surfaciques, tels que les sites d'adsorption (sites passifs) et ignore les diverses voies d'absorption propres à un ion métallique spécifique (*e.g.* zinc, fer, nickel) ainsi que les variations des constantes de complexation des sites de surface en fonction des conditions physico-chimiques du milieu (*i.e.* pH, force ionique), souvent mal précisées dans les bases de données collectant ces constantes. Enfin, l'établissement d'un état d'équilibre entre les espèces métalliques (libres et complexées) en solution et celles liées à la surface biologique, (hypothèse (vi)) est valable seulement dans le cas où l'internalisation du métal est limitante (*i.e.* le flux de diffusion du métal libre et/ou complexé depuis la solution vers la surface de la cellule est rapide par rapport au flux d'internalisation). Ce dernier point est très important puisqu'il sous-entend que les complexes ne contribuent pas aux flux d'internalisation. Toutefois, **Zhao et al., (2016)** font état d'exceptions dans lesquelles les complexes métalliques contribuent à la bioaccumulation du métal. Ces auteurs évoquent

5 cas différents (**Fig. 6**). Tout d'abord, les complexes lipophiles qui ont la capacité de diffuser passivement à travers la bicouche lipidique des membranes biologiques (**type 1, Fig.6**). Ce processus a notamment été observé pour  $\text{HgCl}_2^0$  dans l'étude de **Mason et al., (1996)**. Un autre cas à considérer est celui des complexes hydrophiles (**type 2, Fig.6**). **Krom et al., (2000)** et **Blancato et al., (2006)** ont démontré que certains complexes métalliques pouvaient pénétrer dans la cellule en utilisant des transporteurs membranaires spécifiques. Ceci a été observé pour le citrate, qui lors de son absorption dans la cellule est transporté sous la forme d'un complexe établi avec divers ions, dont des ions métalliques libres tels que  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Le troisième cas documenté est celui des complexes ternaires formés par la liaison d'un ion métallique, d'un ligand biotique et d'un troisième ligand sur la surface biologique (*e.g.* le complexe aluminofluoride ( $\text{AlF}_x$ ) observé sur les cellules branchiales de *Micropterus salmoides*) (**Wilkinson et al., 1993**) (**type 3, Fig. 6**). Un autre cas est celui des complexes métalliques labiles qui ont la capacité de se dissocier et de contribuer au flux de bioaccumulation du métal (**type 4, Fig. 6**). Ce dernier cas, sera discuté dans la partie III-3 de ce chapitre. Enfin, le dernier exemple donné par **Zhao et al., (2016)** est la prise en compte des caractéristiques intrinsèques de l'ion métallique (*e.g.* la cinétique de déshydratation de l'ion libre), lesquelles influencent la labilité des complexes. Ce dernier point fait appel au mécanisme d'Eigen-Wilkins, qui permet de déterminer à partir des valeurs des cinétiques de déshydratation, les métaux susceptibles de s'associer et se dissocier plus ou moins lentement avec un ligand biotique et par conséquent de contribuer ou non au flux d'internalisation (**type 5, Fig. 6**).



**Fig. 6 :** Représentation des 5 exceptions aux modèles d'équilibre lors de l'évaluation de la biodisponibilité des complexes métalliques. M représente le métal libre tandis que ML représente le complexe métallique avec le ligand L.  $K_{ML}$  est la constante de stabilité des complexes ML. Les ronds violets représentent un ligand biotique à la surface de l'organisme (souvent un transporteur de métaux). Les paramètres  $k_a$  et  $k_d$  représentent les constantes d'association et de dissociation du métal avec le ligand biotique ;  $k_{int}$  représente la constante d'internalisation du métal à travers la membrane cellulaire.  $D_M$  et  $D_{ML}$  représentent les coefficients de diffusion de M et ML. Le type 1 correspond à la diffusion passive de complexes métalliques lipophiles. Le type 2 représente l'absorption de complexes métalliques hydrophiles par un transporteur de ligands. Le type 3 est la réaction d'un complexe avec un ligand biotique à la surface de la cellule (complexe ternaire). Le type 4 représente un exemple où les complexes métalliques labiles peuvent contribuer à l'absorption des métaux (limitation par le coefficient de diffusion). Le type 5 représente la situation où  $k_{int} > k_a$  (d'après Zhao et al, 2016)

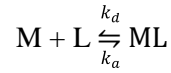
Bien que BLM et FIAM aient été extrêmement utiles dans de nombreux cas pour expliquer les liens entre la spéciation du métal et les effets biologiques (sans que leurs conditions d'applicabilité aient été nécessairement validées quantitativement), les cinq exceptions susmentionnées démontrent l'importance, pour d'autres cas, de prendre en considération les complexes métalliques et certains aspects dynamiques passés sous silence par ces modèles classiques. En raison de leur possible contribution aux flux d'internalisation, la prise en compte de ces aspects dynamiques qui régissent la biodisponibilité des métaux tels que leur transport de la solution vers la surface cellulaire et leurs cinétiques d'association et de dissociation à proximité de la biointerface est nécessaire pour une interprétation correcte de la biodisponibilité des métaux et de leurs impacts sur les organismes.

### 3.3. Modèle dynamique de spéciation des métaux

#### 3.3.1. Cas des ligands moléculaires

Le modèle établi par **van Leeuwen, (1999)** est l'un des premiers modèles à tenir compte de la dimension dynamique absente du modèle BLM *i.e.* les flux de diffusion ( $J_{diff}$ ) des métaux libres (M) et complexés (ML) dans la couche de diffusion jusqu'à la biomembrane, le flux de dissociation des

complexes ( $J_{kin}$ ) au niveau de la couche de réaction, le flux d'internalisation ( $J_{int}$ ). Il considère une situation où un organisme est en contact avec un milieu contenant à la fois des ions métalliques libres (M) et des complexes métalliques (ML) formés avec un ligand moléculaire (L). La transition de la forme libre à la forme complexée est décrite par la réaction de complexation suivante :



avec  $k_a$  ( $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ ) et  $k_d$  ( $s^{-1}$ ), les constantes cinétiques d'association et de dissociation du complexe. La constante  $k_a$  est notamment décrite par le mécanisme d'Eigen-Fuoss (**van Leeuwen et al., 2013**). Ce mécanisme est constitué de deux étapes successives, *i.e.* la formation d'un complexe ( $ML_{aq}$ ) dit de sphère externe issue de l'association d'un métal ( $M_{aq}$ ) et d'un ligand L, suivie de la formation d'un complexe ML dit de sphère interne issue de la substitution d'une molécule d'eau du complexe ( $ML_{aq}$ ). Les constantes de réaction associées à ces étapes sont respectivement notées  $K_{os}$  ( $m^3 \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ ) et  $k_w$  ( $s^{-1}$ ). Ainsi, l'expression de  $k_a$  peut être écrite  $k_a = K_{os} \cdot k_w$ .

Les constantes d'association ( $k_a$ ) et de dissociation des complexes ( $k_d$ ) définissent la constante de stabilité  $K$  par la relation suivante :

$$K = \frac{k_a}{k_d}$$

Dans l'hypothèse où la réaction d'association entre M et L est monomoléculaire et que la concentration en ligands ( $C_L$ ) est bien supérieure à celle de l'ion métallique ( $C_M$ ), il est légitime de considérer la concentration en ligands ( $C_L$ ) constante dans le temps et l'espace. De ce fait, une constante de stabilité  $K'$  (sans dimension) peut être définie selon la relation suivante :

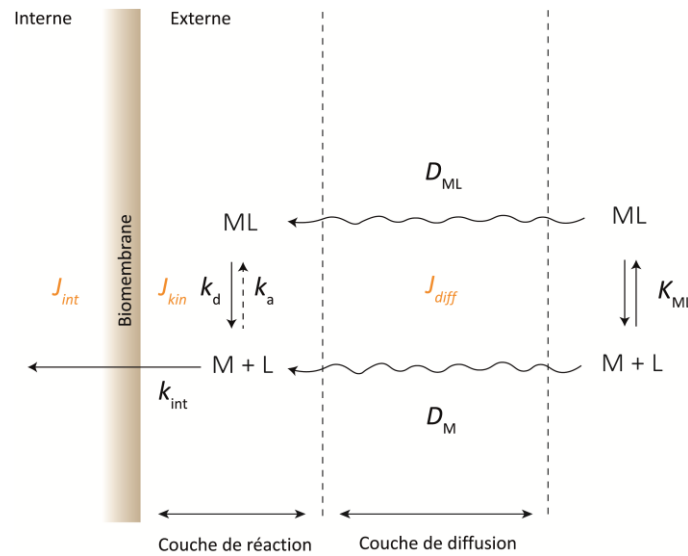
$$K' = K_{C_L} = \frac{k_a'}{k_d}$$

avec

$$k_a' = k_a C_L$$

En tenant compte de ces constantes mais également de la constante d'internalisation ( $k_{int}$ ), du coefficient de diffusion du métal libre (M) ( $D_M$ ) et complexé (ML) ( $D_{ML}$ ), il est possible de déterminer les flux de diffusion ( $J_{diff}$ ) des métaux libres (M) et complexés (ML) dans la couche de diffusion jusqu'à la biomembrane, le flux de dissociation des complexes ( $J_{kin}$ ) au niveau de la couche de réaction, le flux

d'internalisation ( $J_{int}$ ) et les échelles de temps relatives à ces processus (**Fig. 7**) (**van Leeuwen, 1999; van Leeuwen et al., 2005**).

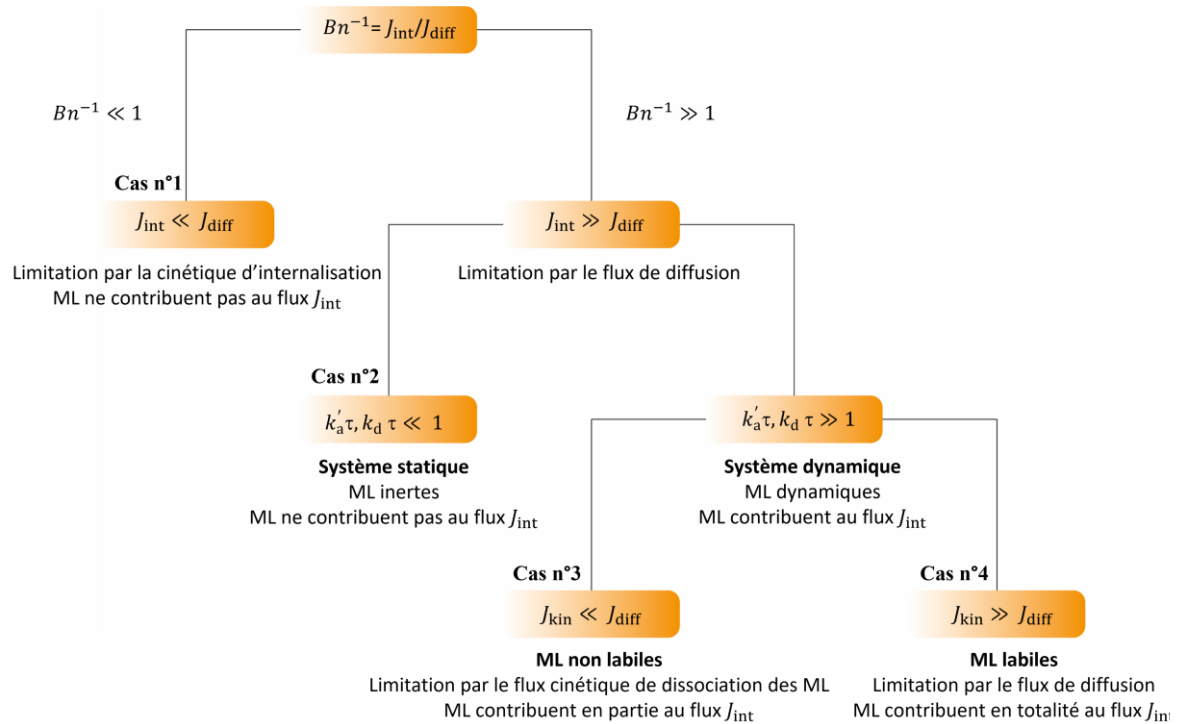


**Fig. 7 :** Représentation des processus dynamiques qui régissent la biodisponibilité des métaux. Les espèces métalliques libres et complexées sont transportées de la solution à la biomembrane. Pendant ce transport les métaux subissent de nombreuses réactions de complexation et de dissociation menant à leur internalisation selon le temps caractéristique de ces processus. M représente le métal libre tandis que ML représente le complexe métallique avec le ligand L.  $K_{ML}$  est la constante de stabilité des complexes ML. Les paramètres  $k_a$  et  $k_d$  représentent les constantes d'association et de dissociation du métal avec le ligand.  $k_{int}$  est la constante d'internalisation,  $D_M$  et  $D_{ML}$  correspondent aux coefficients de diffusion de M et ML.  $J_{int}$  est le flux d'internalisation du métal,  $J_{kin}$ , le flux de dissociation du complexe et  $J_{diff}$  le flux de diffusion du métal de la solution vers la biomembrane (d'après **van Leeuwen, 1999**, modifié).

Ainsi, il est possible à partir des flux et de leurs temps caractéristiques, de fournir une base rigoureuse permettant de déterminer la labilité des complexes, *i.e.* leur capacité à se dissocier et à contribuer au flux de bioaccumulation de métaux libres, et les conditions où cette labilité des complexes métalliques doit être prise en compte.

En bref, à partir de la valeur de  $Bn^{-1}$  (inverse du nombre adimensionnel dit de Bosma) correspondant au ratio entre le flux d'internalisation ( $J_{int}$ ) et du flux de diffusion ( $J_{diff}$ ) des métaux libres, il est possible de déterminer la nature des flux qui limitent (ou déterminent) cinétiquement la bioaccumulation du métal. Ainsi, lorsque  $Bn^{-1} \ll 1$ , le flux de diffusion des métaux libres ( $J_{diff}$ ) est très rapide par rapport au flux d'internalisation ( $J_{int}$ ), ( $J_{int} \ll J_{diff}$ ). Le processus de bioaccumulation est alors contrôlé par la cinétique d'internalisation. Dans cette situation, les complexes ML ne contribuent pas aux flux d'internalisation ( $J_{int}$ ). C'est en fait le cas couvert par les modèles à l'équilibre type BLM (**cas n°1**). Dans le cas contraire, *i.e.* lorsque  $Bn^{-1} \gg 1$ , le flux de diffusion des métaux ( $J_{diff}$ ) est très lent par rapport au flux d'internalisation ( $J_{int}$ ), ( $J_{int} \gg J_{diff}$ ). Ainsi dans ces conditions le

processus de bioaccumulation est limité par la diffusion de M depuis la solution vers la biosurface accumulatrice. Dans cette situation, il est possible de déterminer si les complexes contribuent ou non aux flux de bioaccumulation en examinant les cinétiques de formation et de dissociation des complexes. Plus précisément, lorsque les cinétiques de formation et de dissociation du complexe ML sont très lentes par rapport au temps  $\tau$  de diffusion (stationnaire) des métaux ( $k'_a \tau, k_d \tau \ll 1$ ), le système est considéré comme statique (**cas n°2**). Dans ce cas, les complexes ML ne contribuent pas aux flux d'internalisation ( $J_{\text{int}}$ ), ils sont dits inertes. Le processus important à considérer est alors la seule diffusion de M vers la surface accumulatrice, qui s'accompagne d'un gradient de concentration dans la couche de diffusion (et donc d'une concentration de M à la surface plus petite que dans la solution, excluant ici des considérations électrostatiques pour faire simple). En revanche, le système est considéré dynamique dès lors que les cinétiques de formation et de dissociation du complexe ML sont plus rapides que le flux de diffusion des métaux de la solution vers la surface accumulatrice, ( $k'_a \tau, k_d \tau \gg 1$ ). Dans ce cas, les complexes ML contribuent aux flux d'internalisation des métaux. Ils sont alors dits dynamiques. En fonction des conditions limitantes, il est possible de distinguer la nature de cette contribution des complexes selon leur labilité. Les complexes sont dits non labiles lorsque le flux de diffusion est plus grand que le flux cinétique de dissociation du complexe dans la couche dite de réaction, ( $J_{\text{kin}} \ll J_{\text{diff}}$ ), (**cas n°3**). Dans ce cas, la bioaccumulation est contrôlée dans le temps par la seule cinétique de dissociation des complexes dans la couche dite de réaction (en plus de la contribution des métaux libres non complexés). En revanche, dans le cas de complexes dits labiles, le flux de diffusion est faible par rapport au flux cinétique de dissociation ( $J_{\text{kin}} \gg J_{\text{diff}}$ ), (**cas n°4**). La bioaccumulation est alors contrôlée dans le temps par le seul flux de diffusion couplé des espèces M et ML. Un gradient de concentration est alors établi dans la couche de diffusion pour à la fois M et ML. Les complexes ML contribuent en totalité au flux de bioaccumulation de M en raison de leur dissociation très rapide par rapport à la cinétique de leur apport (par diffusion) vers la biosurface. Les différentes conditions brièvement détaillées ci-dessus sont illustrées en **Fig. 8**.



**Fig. 8:** Représentation du modèle dynamique de van Leeuwen, (1999), où les processus de déplétion des métaux dans le bulk de la solution aqueuse sont ignorés (entre autres).

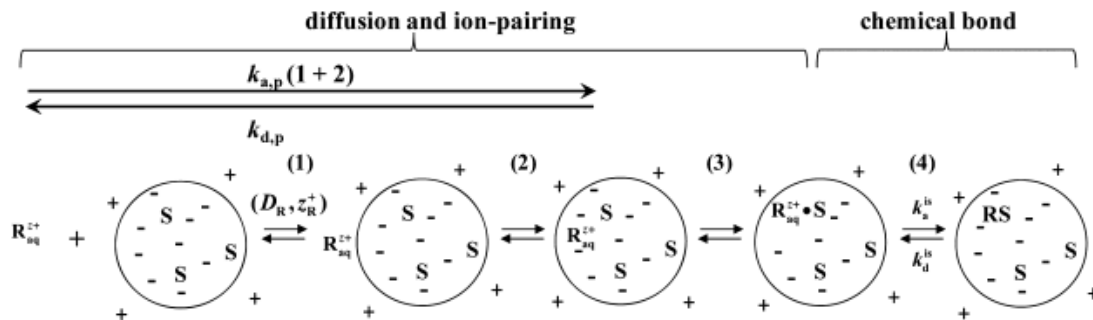
### 3.3.2. Cas des ligands nanoparticulaires

Le modèle établi par **van Leeuwen, (1999)** repose pour partie sur une représentation des constantes cinétiques de formation et dissociation de complexes ML répondant au mécanisme d'Eigen originellement développé pour des ligands moléculaires. Des travaux ultérieurs ont proposé une extension du modèle d'Eigen de cinétique de complexation au cas de ligands (nano)particulaires en faisant le distinguo entre (nano)particules dures (non perméables aux ions de l'électrolyte incluant donc les métaux) et (nano)particules molles (perméables aux ions/métaux) (**Pinheiro et al., 2005 ; Duval et al., 2008 ; van Leeuwen et al., 2013**). Cette extension est en effet requise pour différencier selon la taille et les propriétés électrostatiques des particules et des métaux, les cinétiques de complexation métaux-(nano)particules qui sont dominées par le processus de transfert (*i.e.* diffusion et conduction) des métaux depuis la solution jusqu'au volume réactif des complexants particuliers (ou surface réactive selon la nature des particules considérées).

Ainsi, cette extension du modèle d'Eigen considère la complexation d'un ion aqueux  $R_{aq}^{z+}$  avec un site chargé S contenu sur ou au sein d'une particule sphérique. L'ion  $R_{aq}^{z+}$  est tout d'abord transporté par diffusion et/ou conduction depuis la solution vers la particule (Etape 1). Selon la particule considérée, l'ion  $R_{aq}^{z+}$  peut rester à la surface de la particule (particule dure) ou entrer dans son volume (particule molle) sous forme hydratée (Etape 2). L'ion  $R_{aq}^{z+}$  forme par la suite un complexe de sphère



externe avec les sites S de la particule (Etape 3), et enfin un complexe de sphère interne après perte de molécule d'eau (Etape 4) (**Fig 9**).

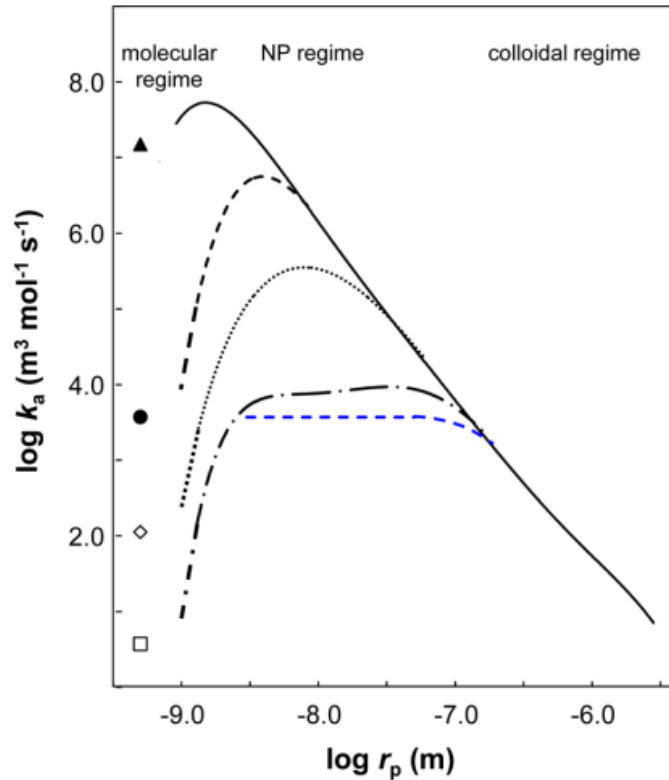


**Fig. 9** : Mécanisme d'Eigen-Fuoss étendu aux ligands (nano)particulaires.  $R_{aq}^{z+}$  correspond à un ion métallique aqueux. (S) et (-) représentent respectivement les sites chargés et non chargés présents au sein d'une nanoparticule sphérique. Les (+) désignent la charge de la solution électrolytique. Les étapes sont (1) la diffusion de  $R_{aq}^{z+}$  de la solution (*bulk*) vers la surface de la nanoparticule, (2) l'incorporation dans le corps de la particule en tant qu'ion hydraté libre, (3) la liaison ionique de  $R_{aq}^{z+}$  avec S, formant  $R_{aq}^{z+} \cdot S$ , et (4) la formation/dissociation du complexe RS, engendrant respectivement une déshydratation et réhydratation de l'ion métallique.  $k_{a,p}$  et  $k_{d,p}$  représentent les constantes d'association et de dissociation des étapes (1) et (2) tandis que  $k_a$  et  $k_d$  celles de l'étape (4) (d'après (van Leeuwen et al., 2013)).

L'ajout des étapes 1 et 2 au mécanisme d'Eigen original permet de tenir compte de la différence de répartition des sites réactifs entre les suspensions de ligands moléculaires (homogènes dans la solution) et particulaires (répartis sur ou au sein de la particule) mais également de la différence de taille qui influence le transport des métaux depuis le milieu vers les sites réactifs des ligands (**van Leeuwen et al., 2013**). Ce dernier effet est mis en évidence sur la **Fig. 10** qui représente les variations de la constante d'association  $k_a$  entre un métal et un ligand de taille moléculaire (<1 nm), particulaire (1-1000 nm) ou colloïdale (>1000 nm) en fonction de la constante de déshydratation  $k_w$  du métal.

Ainsi dans le cas d'un ligand moléculaire (triangle noir, rond noir, losange noir ouvert, carré noir ouvert, **Fig.10**), la cinétique d'association d'un ion métallique avec le ligand (constante cinétique  $k_a$  de formation du complexe) est uniquement limitée par l'étape de déshydratation du complexe de sphère externe, c'est la situation classique donnée par le mécanisme d'Eigen. Dans le cas d'une (nano)particule chargée négativement (courbe noire pleine et pointillés noirs, **Fig. 10**), la constante d'association  $k_a$  augmente tout d'abord avec la taille du ligand particulaire en raison d'effets électrostatiques selon deux processus mentionnés ci-dessous, puis diminue pour des tailles suffisamment importantes en raison de la limitation du processus de complexation par la diffusion du ligand depuis la solution vers les sites réactifs S de la particule. Les deux processus électrostatiques sont l'accélération de la conduction des ions métalliques (chargés positivement) depuis la solution vers la particule (chargée négativement), et

surtout l'augmentation de la concentration en ions métalliques à la surface et/ou dans le volume de la particule (processus d'accumulation des métaux de type Boltzmann).



**Fig. 10** Constante d'association,  $k_a$ , en fonction de la taille des ligands,  $r_p$  (m), pour la cas des ions métalliques aqueux ayant des constantes de déshydratation  $k_w = 4.10^9 \text{ s}^{-1}$  (courbe noire pleine, triangle noir plein),  $k_w = 1.10^6 \text{ s}^{-1}$  (courbe noire en pointillés, point noir plein),  $k_w = 3.10^4 \text{ s}^{-1}$  (courbe noire en pointillés, losange noir ouvert), et  $k_w = 1.10^3 \text{ s}^{-1}$  (courbe noire en pointillés, carré noir ouvert) avec une densité de charge de  $-2000 \text{ mol.m}^{-3}$  et une densité de sites réactifs de  $45 \text{ mol.m}^{-3}$  dans une solution saline à 10 mM. La courbe en pointillés bleu représente un ligand non chargé avec un  $k_w = 1.10^6 \text{ s}^{-1}$  (d'après van Leeuwen et al., (2013)).

(Duval, 2017) a développé un formalisme adimensionnel que je ne détaillerai pas ici et qui permet d'évaluer de manière précise la nature de l'étape limitante qui régit les formations et dissociations de complexes métalliques nanoparticulaires, et ce selon la nature du métal et sa valence, la composition du milieu (salinité, pH) et les caractéristiques de taille et de charge de la particule. Cette étape peut être la diffusion conductive du métal vers/depuis la (nano)particule, ou encore les cinétiques chimiques de formation/dissociation des complexes de sphère externe ou interne avec les sites réactifs. Ce formalisme intègre par ailleurs la nature des (nano)particules considérées, à savoir particules molles, dures, ou de type cœur/couronne. Cette formulation théorique a constitué une base de départ pour évaluer la labilité des complexes (nano)particulaires (Duval et al., 2017) à proximité d'interfaces biologiques

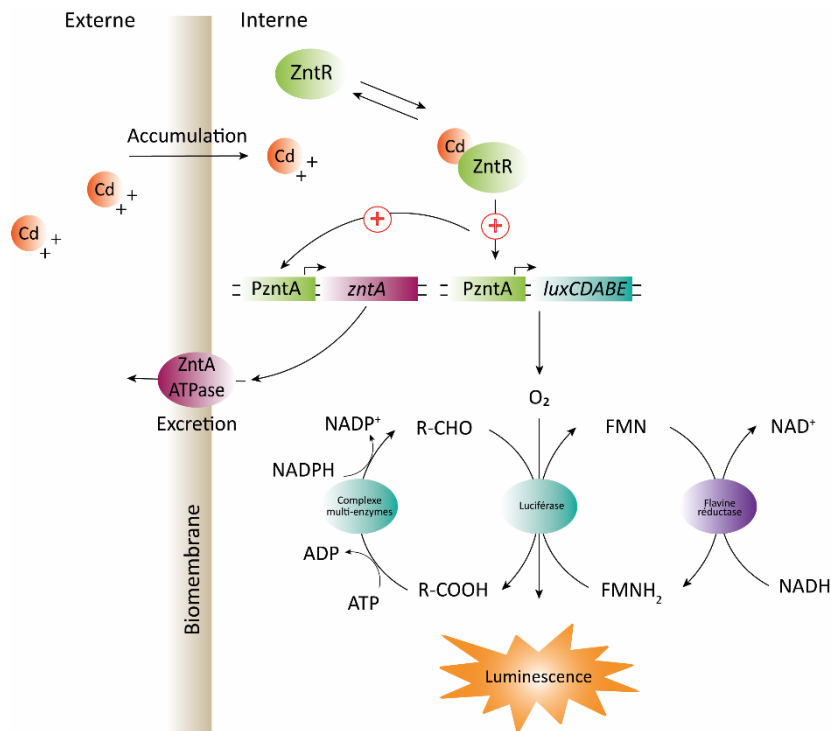
accumulatrices de métaux ou de senseurs électrochimiques, et ainsi estimer la (bio)disponibilité de complexes (nano)particulaires en fonction de leur cinétique de dissociation au voisinage de ces (bio)systèmes.

### 3.4. Biosenseurs bactériens bioluminescents à détection de métaux

#### 3.4.1. Stratégie de construction et fonctionnement

Comme expliqué dans la partie **I-3**, la construction des biosenseurs repose sur la fusion des gènes *lux* issus des bactéries naturellement bioluminescentes à un promoteur exprimé de manière constitutive ou inductible (impliqués dans des stratégies d'homéostasie/résistance/réparation).

Dans le cas des biosenseurs bactériens dédiés à la détection de métaux, leur conception repose sur l'exploitation de mécanismes d'homéostasie et/ou de résistance aux métaux qui ont été développés par les bactéries au cours de leur évolution. Le mécanisme le plus couramment mis en œuvre s'appuie sur les systèmes de pompe à efflux de type ATPase. Ce dernier implique l'utilisation de protéines régulatrices appartenant à la famille des MerR, connues pour leur affinité pour les métaux (*e.g.* MerR (mercure), CueR (cuivre, or argent), PbrR (plomb), ZntR (zinc, cadmium, plomb)) (**Brown et al., 2003**). Produites de manière constitutive par des gènes localisés sur le chromosome bactérien, ces protéines jouent le rôle d'activateurs transcriptionnels pour maintenir une concentration intracellulaire optimale en métaux essentiels et non essentiels. Lors de l'accumulation des métaux au sein de la cellule, ces protéines se lient aux ions métalliques internalisés et forme un complexe qui induit l'expression du gène lié au système d'efflux par activation du promoteur. En revanche, en l'absence de métaux, ces protéines se lient au promoteur et inhibent la transcription du gène (**Brocklehurst et al., 1999 ; Khan et al., 2002; Brown et al., 2003 ; Hynninen & Virta, 2010**). Dans le cas des biosenseurs bactériens à détection de métaux, le promoteur impliqué dans ce mécanisme est fusionné aux gènes rapporteurs *lux*. L'expression des gènes rapporteurs est alors induite lors de l'internalisation des métaux au sein de la cellule conduisant ainsi à l'émission de luminescence. Une représentation schématique du fonctionnement des biosenseurs bactériens luminescents inductibles aux ions cadmium utilisés dans ces travaux est donnée en **Fig. 11**.



**Fig. 11 :** Représentation schématique du fonctionnement d'un biosenseur bactérien bioluminescent spécifique inductible au Cd(II). Mécanisme de résistance aux métaux : une fois les ions Cd(II) accumulés dans la cellule, ces derniers se lient à une protéine régulatrice appartenant à la famille MerR, la protéine ZntR. Cette dernière, produite de manière constitutive par le gène chromosomique *zntR*, se lie au Cd(II). Le complexe ZntR-Cd active la transcription du gène *zntA* qui code pour une pompe ATPase de type P permettant l'excrétion du Cd(II). En l'absence de Cd(II), la protéine ZntR se lie au promoteur *pzntA*, inhibant ainsi la transcription du gène. Stratégie de l'ADN recombinant : une fois le promoteur *pzntA* fusionné avec l'opéron *luxCDABE*, le complexe ZntR-Cd active la transcription des gènes *lux* en interagissant avec le promoteur *pzntA*. Ces gènes *lux* codent pour différentes protéines impliquées dans la réaction de bioluminescence. Les gènes *luxA* et *luxB* codent pour la luciférase et *luxC*, *luxD* et *luxE* pour le complexe multi-enzymes constitué d'une réductase, d'une transférase, et d'une synthétase. La luciférase catalyse l'oxydation du FMN<sup>H</sup> et de l'aldéhyde en présence d'O<sub>2</sub> conduisant à une émission de bioluminescence. La flavine réductase convertit la flavine libre (FMN) en flavine réduite (FMN<sup>H</sup>) et le complexe multi-enzymes est responsable de la synthèse de l'aldéhyde.

### 3.4.2. Exploitation du signal de bioluminescence

Suivant cette stratégie de construction, de nombreux biosenseurs bactériens bioluminescents ont été développés pour détecter des métaux (*e.g.* mercure, zinc, arsenic, plomb) mais relativement peu ont été commercialisés ou utilisés in situ pour de la surveillance environnementale (**Tableau V**) (**Shin, 2011 ; Xu et al., 2013**). Ceci s'explique par la complexité des différents processus biologiques et physicochimiques intra- et extra-cellulaires qui régissent la réponse temporelle de bioluminescence et des méthodologies communément employées pour relier la bioluminescence émise à la concentration en ions biodisponibles.

**Tableau V** : Construction de biosenseurs à détection de métaux (d'après Durand et al., (2015)).

Micro-organisme	Construction	Analyte cible	Application environnementale	Référence
<i>Escherichia coli</i>	<i>ars-luxAB</i>	As	Eau potable, eau souterraine	Stocker et al., (2003) Charrier et al., (2011) Trang et al., (2005)
	<i>ars-luxCDABE</i>	As	Eau et sédiment	Ivask et al., (2007)
	<i>copA-luxCDABE</i>	Cu, Ag	-	Riether et al., (2001) Ivask et al., (2009) Ivask et al., (2010)
	<i>mer-luxCDABE</i>	Hg	Eau et sédiment	Ivask et al., (2007) Ivask et al., (2009)
	<i>zntA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	-	Riether et al., (2001) Ivask et al., (2009) Ivask et al., (2010)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>mer-luxCDABE</i>	Hg	-
<i>copA-luxCDABE</i>		Cu	-	Ivask et al., (2009)
<i>zntA-luxCDABE</i>		Cd, Pb, Zn, Hg	-	Ivask et al., (2009)
<i>pbrA-luxCDABE</i>		Pb	-	Ivask et al., (2009)
<i>cadA-luxCDABE</i>		Cd	-	Ivask et al., (2009)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>cadA-luxCDABE</i>	Zn	Sol	Hynninen et al., (2010)
	<i>czc-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn	Sol	Hynninen et al., (2010)
	<i>pupA-luxCDABE</i>	Fe	-	Khang et al., (1997)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>cadA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	-	Ivask et al., (2009)
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>cnr-luxCDABE</i>	Ni, Co	-	Tibazarwa et al., (2001)

---

<b>Micro-organisme</b>	<b>Construction</b>	<b>Analyte cible</b>	<b>Application environnementale</b>	<b>Référence</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>cadA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	-	Ivask et al., (2009)
<i>Ralstonia eutropha</i>	<i>cnr-luxCDABE</i>	Ni, Co		Tibazarwa et al., (2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>cadA-luxCDABE</i>	Cd, Pb, Zn, Hg	-	Ivask et al., (2009)

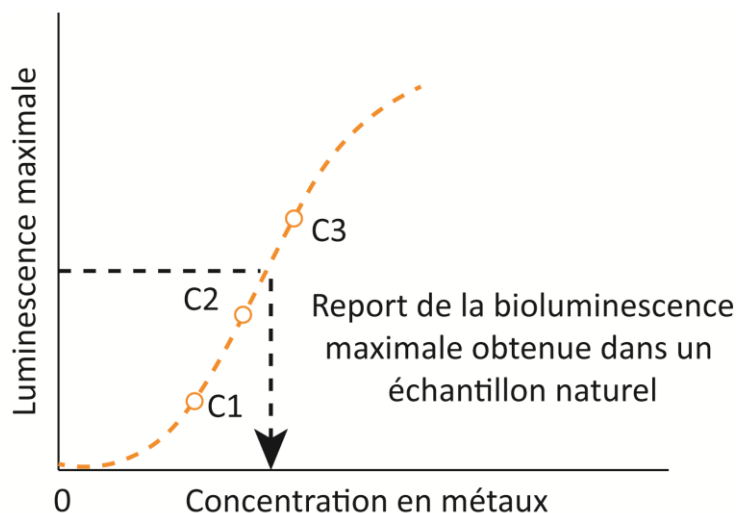
---

En effet, le signal temporel des biosenseurs dépend de la fraction internalisée du métal ciblé, et notamment, de la dynamique des différents processus qui déterminent la distribution des métaux sous forme libre ou complexée à l'interphase entre le biosenseur et le milieu extracellulaire (**Pagnout et al., 2018; Duval & Pagnout, 2019**). Le signal dépend donc du type de biosenseur et de la composition du milieu, laquelle impacte le transfert réactif des métaux de la solution à la surface bactérienne (*i.e.* diffusion conductive) (**Duval & Rotureau, 2014**), leur complexation (**Duval & Rotureau, 2014**), leurs biosorptions passives et actives (**Duval & Rotureau, 2014 ; Pagnout et al., 2018**), leur bioaccumulation (**Duval & Rotureau, 2014**) et leur excrétion (**Duval & Rotureau, 2014**). Le signal des biosenseurs est en outre intimement déterminé par l'efficacité de la transcription des gènes rapporteurs activés par la protéine régulatrice. Cette efficacité détermine la quantité de protéines produites (*i.e.* la luciférase) (**Kelly et al., 2003 ; Dell Side et al., 2017 ; Pagnout et al., 2018**) et est impactée par la physiologie des biosenseurs, laquelle contrôle leur capacité à produire la luminescence et leur tolérance/résistance aux effets toxiques potentiels des métaux ou autres xénobiotiques (antibiotiques, nanoparticules, phénols et leurs dérivés, etc.) présents en solution (**Abbas et al., 2018 ; Pagnout et al., 2018**). La réponse des biosenseurs est également fonction de la qualité nutritionnelle du milieu qui permet le maintien de la viabilité des biosenseurs et des activités cellulaires (**Shin, 2011**) et conditionne les performances des biosenseurs en fournissant les besoins énergétiques nécessaires à la production de lumière (*i.e.* les acides aminés et les sucres). Ces besoins énergétiques peuvent être plus ou moins satisfaits en fonction de la qualité des nutriments mais également de leur disponibilité, qui est évidemment fonction de la composition du milieu et donc des interactions avec les éléments présents comme les métaux (**Rathnayake et al., 2013**). Cela a été démontré dans plusieurs études. **Nealson et al., (1972)** ont par exemple démontré que la synthèse et l'activité de la luciférase étaient étroitement liées à l'activité métabolique des bactéries. Plus spécifiquement, cela dépendait de la nature de la source de carbone présente dans le milieu et de l'efficacité avec laquelle les cellules utilisaient cette ressource. Dans l'étude de **Shimada & Tanaka, (2016)**, la dynamique des flux métaboliques intracellulaires d'*Escherichia coli* BW25113 a été évaluée en suivant l'expression de l'activité luciférase bactérienne. En présence d'une quantité limitée de glucose, les auteurs ont observé des fluctuations de l'activité luciférase dues au phénomène de répression catabolique. Cette réponse adaptative décrite à l'origine par Monod, sous le nom de " diauxie " et plus récemment sous le nom de *répression catabolique*, correspond à une croissance bactérienne biphasée par utilisation hiérarchique de deux sources de carbone (**Shimada & Tanaka, 2016**). Typiquement, les bactéries utilisent la source de carbone la plus rapidement métabolisable (glucose pour *E.coli*) et inhibent la synthèse des enzymes impliquées dans le catabolisme de la source de carbone non préférentielle. Ce n'est que lorsque la source de carbone préférentielle est totalement épuisée que les bactéries vont induire la synthèse des enzymes nécessaires à la dégradation de la source de carbone secondaire. Dans leur étude, ce phénomène se traduit par l'apparition séquentielle de pics de luminescence, chacun d'entre eux correspondant à une phase particulière du

métabolisme carboné (*i.e.* glycolyse et cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)/gluconéogenèse). Plus récemment **Duval & Pagnout, (2020)** ont mis en évidence qu'une diminution de la concentration en acides aminés dans la solution (à concentration cellulaire totale constante dans le temps) entraîne le passage d'un signal dit monomodal (1 pic) à bimodal (2 pics) dû à un mécanisme de régulation global appelé la *réponse stringente*. Dans un souci d'économie d'énergie, les bactéries vont utiliser préférentiellement les acides aminés présents dans le milieu pour se développer et se multiplier. Ce n'est que lorsque ces acides aminés ne sont plus biodisponibles dans le milieu que les bactéries vont les synthétiser. Le passage d'un excès, au manque d'acides aminés génère une phase de latence durant laquelle les bactéries vont s'adapter et synthétiser les enzymes nécessaires à la production de nouveaux acides aminés. Plus précisément, lorsqu'il y a pénurie d'acides aminés dans le milieu, la concentration en ARNt non chargés liés au ribosome va augmenter. Cet état ribosomal est reconnu par RelA, qui se lie à la sous-unité 50S et adopte une conformation active. L'activation de RelA et la synthèse consécutive de (p)ppGpp conduisent à sa dissociation du ribosome, suivie de nombreux cycles de synthèse de (p)ppGpp. L'augmentation des niveaux de (p)ppGpp dirige les ressources métaboliques cellulaires vers la synthèse de nouveaux acides aminés, ce qui rétablit les niveaux normaux en ARNt chargés (**Hauryliuk et al., 2015 ; Duval & Pagnout, 2020**)

Les méthodologies actuellement employées pour corrélérer la concentration en ions métalliques biodisponibles et le signal de bioluminescence reposent sur deux approches. La première consiste à établir une courbe d'étalonnage à partir de l'intensité de bioluminescence émise par les biosenseurs à un temps donné (correspondant généralement à l'intensité maximale du signal) dans des milieux de références contenant une concentration connue en métal cible. La réponse des biosenseurs est ensuite mesurée dans un échantillon environnemental à analyser et sa valeur est reportée sur la courbe d'étalonnage préétablie. La concentration en métaux de l'échantillon est alors déterminée par simple lecture de la luminescence au temps préalablement défini (**Fig. 12**) (**Stocker et al., 2003 ; Tecon & Meer, 2008 ; van der Meer & Belkin, 2010**). La seconde approche consiste quant à elle, à utiliser des calculs de spéciation thermodynamique (*e.g.* Visual MINTEQ) basés sur des modèles thermodynamiques, par exemple le modèle du ligand biotique (BLM) et le modèle de l'activité des ions libres (FIAM) (**Tecon & Meer, 2008 ; Li et al., 2022 ; Zhu et al., 2022**).





**Fig. 12:** Représentation d'une courbe de calibration. C1, C2 et C3 correspondent à 3 solutions de calibration (concentrations connues) (d'après Van der Meer & Belkin, (2010) modifié).

Néanmoins, ces approches souffrent d'un certain nombre d'approximation. Elles ne tiennent pas compte de la contribution possible des complexes métalliques au flux de bioaccumulation, des exigences énergétiques permettant de produire et maintenir la bioluminescence, de la déplétion des métaux en solution (*i.e.* variation de la concentration en métal dans le milieu au cours du temps), lesquels influencent la réponse temporelle de bioluminescence. Ceci implique de prendre en compte des processus dynamiques qui contrôlent le transfert des métaux à la surface des cellules, leur adsorption et leur bioaccumulation, les cinétiques d'association et de dissociation du métal avec un ligand moléculaire et/ou particulaire et les coefficients de diffusion du métal sous forme libre ou complexé.

A notre connaissance, seuls quelques travaux (**Pagnout et al., 2018 ; Duval & Pagnout, 2019, 2020**) ont démontré explicitement les relations entre la dépendance temporelle du signal de bioluminescence émis et différents paramètres clés biologiques et physico-chimiques intra- et extracellulaire. Ces travaux ont couplé expérimentations et modélisations théoriques afin de reproduire la réponse temporelle de biosenseurs *Escherichia coli* contenant la fusion des gènes *zntA-luxCDABE* inductibles par Cd(II) dans différentes conditions incluant les modulations de la force ionique du milieu, de la concentration cellulaire, des charges électrostatiques de la surface des biosenseurs (**Pagnout et al., 2018**) et plus récemment de la qualité nutritive du milieu (**Duval & Pagnout, 2020**), et ce, dans le régime de bioaccumulation correspondant à une réponse linéaire des biosenseurs avec la concentration totale de cadmium en solution. Ces résultats ont permis d'établir un cadre théorique qui explique comment la réponse temporelle de bioluminescence est régie par le flux de bioaccumulation, par la cinétique de l'expression des gènes rapporteurs *lux* induite par les métaux, par le taux de production et de dégradation de la luciférase et la cinétique d'émission de photons qui s'ensuit. En outre, ce formalisme théorique a permis de démontrer que la réponse temporelle des biosenseurs n'était pas

linéairement liée à la photoactivité cellulaire (capacité globale du biosenseur à produire de la lumière) mais à un produit de convolution entre 2 fonctions temporelles, l'une modélisant le flux de bioaccumulation du métal, la cinétique d'activation du gène rapporteur *lux*, le taux de production de la luciférase, la cinétique d'émission lumineuse et son quenching au cours du temps, et l'autre représentant la dépendance de la concentration en cellules photoactives avec le temps.

$$\mathcal{Lum}(t) = \Psi c_p^{\max} J_{u,M} [F(t) \otimes \bar{c}_p(t)]$$

avec  $\psi = S_a V_T k_f \tau_q K_{Hi}^{-1}$ , où  $S_a$  correspond à la surface d'un biosenseur,  $V_T$  au volume total dans lequel sont dispersés les biosenseurs,  $k_v$  à la constante cinétique d'émission de photons par quantité de luciférase,  $k_f$  et  $\tau_q$  aux cinétique de production et le temps de quenching de la luciférase respectivement,  $K_{Hi}^{-1}$  la réciproque de la constante de dissociation de Hill entre promoteur et complexe protéine régulatrice/métal.  $J_u$  correspond quant à lui au flux de bioaccumulation du métal,  $c_p^{\max}$  à la concentration en cellules photoactives,  $F(t)$  est une fonction temporelle détaillée dans **Duval et Pagnout 2019**,  $\otimes$  correspond au produit de convolution et  $\bar{c}_p(t)$  est la concentration (normalisée) en cellules photoactives au temps  $t$ .

#### 4. Objectifs

Sur la base de ces résultats, les objectifs de ce travail de thèse visent à décrypter la réponse temporelle d'un biosenseur bioluminescent sensible au Cd(II), avec un focus sur les effets de spéciation des métaux (non pris en compte dans les études précédentes) et les effets liés à la qualité nutritive du milieu.

Ainsi, le premier objectif de cette thèse est d'élargir le cadre conceptuel établi par **Duval & Pagnout, (2020)** en exploitant les deux mécanismes de régulation globale précédemment décrits permettant aux bactéries de s'adapter rapidement à un changement de leur milieu environnant. A savoir, (i) la *réponse stringente*, correspondant à la phase de transition durant laquelle la bactérie va passer d'une situation où elle utilise les acides aminés présents dans le milieu à une situation où elle va synthétiser les acides aminés dont elle a besoin lorsque ceci viennent à manquer (situation de carence). Et (ii) la *répression catabolique* correspondant à l'utilisation préférentielle d'une source de carbone facilement dégradable (*e.g.* glucose pour *E. coli*) lorsque plusieurs sources sont disponibles pour la bactérie dans le milieu. Cette répression sera levée lorsque la source de carbone préférentielle sera épuisée. A cette fin, des mesures de la réponse temporelle de bioluminescence des biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductible au Cd (II) et *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* révélateur de l'activité métabolique ont été effectuées sur 48 h dans des milieux différents en termes de sources d'acides aminés (tryptone ou Lysogeny Broth (LB)) et de carbone (glucose, xylose et leurs

mélanges) à des concentrations variables en Cd(II) (0-20 nM). Les signaux de bioluminescence ont été reconstruits avec succès pour toutes les conditions examinées en s'appuyant sur la récente théorie de **Duval & Pagnout, (2020)**. Ces résultats sont présentés dans les **Chapitres 3 et 4**. Plus spécifiquement, le **Chapitre 4** présente une analyse comparative des signaux de bioluminescence qui souligne les différences et les similitudes entre les réponses temporelles de bioluminescence des biosenseurs spécifiques *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd et des biosenseurs non spécifiques *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE*.

Les deux autres objectifs initiaux de cette thèse consistaient à déterminer comment la spéciation/biodisponibilité des métaux se reflète dans le signal temporel de bioluminescence, ou autrement dit, comment la réponse du biosenseur reflète les couplages entre bioaccumulation, biodisponibilité et spéciation des métaux. Ainsi pour avoir un large spectre de scénarios de spéciation nous avons sélectionné 5 ligands moléculaires différents de par la stabilité des complexes qu'ils forment avec le Cd(II) (EDTA, glutathion, cystéine, histidine et acide citrique) et 4 ligands particuliers qui diffèrent en termes de tailles et de charges électrostatiques. Ces derniers ligands sont des *carboxylate modified latex* (CML) correspondant à des microsphères de polystyrène chargées négativement avec du sulfate et une haute densité de groupement carboxyle à leur surface. Des essais de bioluminescence ont été réalisés en présence d'une concentration en Cd(II) initiale fixe et d'une concentration variable en cellules et en ligands moléculaires ou particuliers. Selon la récente théorie de **Duval, et al.** (cf. **Annexe p. 166**) l'ajout de ligands entraîne une diminution de la réponse temporelle de bioluminescence - diminution plus ou moins importante selon la constante thermodynamique du complexe - mais surtout un décalage temporel des pics de luminescence qui est aussi fonction de la concentration bactérienne et de la spéciation du métal. Ceci correspond à une situation où la déplétion du métal dans le milieu est présente. On entend par déplétion la variation (décroissance) au cours du temps de la concentration en métaux en solution (bulk) loin de l'interface accumulatrice suite à la bioaccumulation des métaux par les biosenseurs. Cette déplétion du métal dans le milieu engendre des modifications du flux d'internalisation qui, entre autres paramètres, dépendent de la constante de stabilité des complexes, des déterminants (thermo)dynamiques du transfert réactif du métal jusqu'à la surface accumulatrice et de la labilité des complexes. Ainsi la modification au cours du temps de la concentration en métal en solution (due à la déplétion mentionnée ci-dessus) et de la concentration en cellules photoactives (cet 'éveil' des cellules photoactives dans le temps dépend de la concentration cellulaire totale et des conditions nutritives du milieu) engendre des phénomènes de *crosstalk* cinétiques qui se traduisent ici par les décalages temporels des pics de bioluminescence. Nous démontrons par l'expérimentation le bien-fondé de ces prédictions théoriques et de ces propriétés remarquables des signaux de bioluminescence pour le cas de ligands métalliques de natures moléculaires (*e.g.* petits acides) et particuliers (billes carboxylées) de métaux (**Chapitre 5**).

## Références bibliographiques

- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G. A., Asif Tahir, M., & Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment : A review. *Science of The Total Environment*, 626, 1295-1309.
- Ahn, J.-M., Hwang, E. T., Youn, C.-H., Banu, D. L., Kim, B. C., Niazi, J. H., & Gu, M. B. (2009). Prediction and classification of the modes of genotoxic actions using bacterial biosensors specific for DNA damages. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 767-772.
- Aichberger, H., Loibner, A. P., Celis, R., Braun, R., Ottner, F., & Rost, H. (2006). Assessment of factors governing biodegradability of PAHs in three soils aged under field conditions. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 15(1), 73-85.
- Applegate, B. M., Kehrmeyer, S. R., & Sayler, G. S. (1998). A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) Sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2730-2735.
- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., & Puntès, V. (2009). Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), 850-857.
- Bazhenov, S., Novoyatlova, U., Scheglova, E., Fomin, V., Khrulnova, S., Melkina, O., Chistyakov, V., & Manukhov, I. (2021). Influence of the *luxR* regulatory gene dosage and expression level on the sensitivity of the whole-cell biosensor to acyl-homoserine lactone. *Biosensors*, 11(6), 6.
- Bazhenov, S. V., Novoyatlova, U. S., Scheglova, E. S., Prazdnova, E. V., Mazanko, M. S., Kessenikh, A. G., Kononchuk, O. V., Gnuchikh, E. Y., Liu, Y., Al Ebrahim, R., Zavlilgelsky, G. B., Chistyakov, V. A., & Manukhov, I. V. (2023). Bacterial *lux*-biosensors : Constructing, applications, and prospects. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 13, 100323.
- Bechor, O., Smulski, D. R., Van Dyk, T. K., LaRossa, R. A., & Belkin, S. (2002). Recombinant microorganisms as environmental biosensors : Pollutants detection by *Escherichia coli* bearing *fabA':lux* fusions. *Journal of Biotechnology*, 94(1), 125-132.
- Belkin, S., Smulski, D. R., Dadon, S., Vollmer, A. C., Van Dyk, T. K., & Larossa, R. A. (1997). A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. *Water Research*, 31(12), 3009-3016.
- Ben-Israel, O., Ben-Israel, H., & Ulitzur, S. (1998). Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying *lux* genes fused to stress promoters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4346-4352.
- Bispo, A., Jourdain, M. J., & Jauzein, M. (1999). Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Organic Geochemistry*, 30(8, Part 2), 947-952.
- Blancato, V. S., Magni, C., & Lolkema, J. S. (2006). Functional characterization and  $\text{Me}^{2+}$  ion specificity of a  $\text{Ca}^{2+}$ -citrate transporter from *Enterococcus faecalis*. *The FEBS Journal*, 273(22), 5121-5130.
- Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L., & Morby, A. P. (1999). ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31(3), 893-902.

- Brodl, E., Winkler, A., & Macheroux, P. (2018). Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 551-564.
- Brouwer, H., Murphy, T., & McArdle, L. (1990). A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(11), 1353-1358.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 145-163.
- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., & Ruedel, H. (2003). Lessons from case studies of metals : Investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 45-51.
- Charrier, T., Chapeau, C., Bendria, L., Picart, P., Daniel, P., & Thouand, G. (2011). A multi-channel bioluminescent bacterial biosensor for the on-line detection of metals and toxicity. Part II : Technical development and proof of concept of the biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(4), 1061-1070.
- Corrêa, A. X. R., Tiepo, E. N., Somensi, C. A., Sperb, R. M., & Radetski, C. M. (2010). Use of ozone-photocatalytic oxidation (O<sub>3</sub>/UV/ TiO<sub>2</sub>) and biological remediation for treatment of produced water from petroleum refineries. *Journal of Environmental Engineering*, 136(1), 40-45.
- Deheyn, D. D., Bencheikh-Latmani, R., & Latz, M. I. (2004). Chemical speciation and toxicity of metals assessed by three bioluminescence-based assays using marine organisms. *Environmental Toxicology*, 19(3), 161-178.
- Delle Side, D., Nassisi, V., Pennetta, C., Alifano, P., Di Salvo, M., Talà, A., Chechkin, A., Seno, F., & Trovato, A. (2017). Bacterial bioluminescence onset and quenching : A dynamical model for a quorum sensing -mediated property. *Royal Society Open Science*, 4(12), 171586.
- Deryabin, D. G., Efremova, L. V., Karimov, I. F., Manukhov, I. V., Gnuchikh, E. Yu., & Miroshnikov, S. A. (2016). Comparative sensitivity of the luminescent *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* strains to toxic effects of carbon-based nanomaterials and metal nanoparticles. *Microbiology*, 85(2), 198-206. <https://doi.org/10.1134/S0026261716020053>
- Di Toro, D. M., Allen, H. E., Bergman, H. L., Meyer, J. S., Paquin, P. R., & Santore, R. C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(10), 2383-2396.
- Ding, K., Lu, L., Wang, J., Wang, J., Zhou, M., Zheng, C., Liu, J., Zhang, C., & Zhuang, S. (2017). In vitro and in silico investigations of the binary-mixture toxicity of phthalate esters and cadmium (II) to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *The Science of the Total Environment*, 580, 1078-1084.
- Dunlap, P. V. (2009). Bioluminescence, microbial. In *Encyclopedia of Microbiology* (p. 45-61).
- Durand, M. J., Hua, A., Jouanneau, S., Cregut, M., & Thouand, G. (2015). Detection of metal and organometallic compounds with bioluminescent bacterial bioassays. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Duval, J. F. L. (2017). Chemodynamics of metal ion complexation by charged nanoparticles : A dimensionless rationale for soft, core-shell and hard particle types. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(19), 11802-11815.

- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2019). Decoding the Time-Dependent Response of Bioluminescent Metal-Detecting Whole-Cell Bacterial Sensors. *ACS Sensors*, 4(5), 1373-1383.
- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2020). Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters : Experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127751.
- Duval, J. F. L., Pinheiro, J. P., & Leeuwen, H. P. van. (2008). Metal speciation dynamics in monodisperse soft colloidal ligand suspensions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112(31), 7137-7151.
- Duval, J. F. L., & Rotureau, E. (2014). Dynamics of metal uptake by charged soft biointerfaces : impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(16), 7401-7416.
- Duval, J. F. L., Town, R. M., & van Leeuwen, H. P. (2017). Applicability of the reaction layer principle to nanoparticulate metal complexes at a macroscopic reactive (bio)interface : a theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(35), 19147-19161.
- Dyk, T. K. V., 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.
- Dzyadevych, S. V., & Chovelon, J.-M. (2002). A comparative photodegradation studies of methyl parathion by using Lumistox test and conductometric biosensor technique. *Materials Science and Engineering: C*, 21(1), 55-60.
- el-Alawi, Y. S., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (2001). Effects of a pre-incubation period on the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology*, 16(3), 277-286.
- Ellouze, M., Saddoud, A., Dhouib, A., & Sayadi, S. (2009). Assessment of the impact of excessive chemical additions to municipal wastewaters and comparison of three technologies in the removal performance of pathogens and toxicity. *Microbiological Research*, 164(2), 138-148.
- Elsemore, D. A. (1998). Insertion of promoter region::*luxCDABE* fusions into the *Escherichia coli* chromosome. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 102, 97-104. <https://doi.org/10.1385/0-89603-520-4:97>
- Farré, Marinel. I., García, M.-J., Tirapu, L., Ginebreda, A., & Barceló, D. (2001). Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. *Analytica Chimica Acta*, 427(2), 181-189.
- Farré, M., Asperger, D., Kantiani, L., González, S., Petrovic, M., & Barceló, D. (2008). Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8), 1999-2007.
- Farré, M., & Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 299-310.

- Fekete-Kertész, I., Píszmán, D., & Molnár, M. (2017). Particle Size and Concentration Dependent Ecotoxicity of Nano- and Microscale TiO<sub>2</sub>—Comparative Study by Different Aquatic Test Organisms of Different Trophic Levels. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(7), 245.
- Fernández-Piñas, F., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., González-Pleiter, M., & Angeles Muñoz-Martín, M. (2014). Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 145, 65-135.
- Girrotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G., & Maiolini, E. (2008). Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 608(1), 2-29.
- Gochfeld, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 174-179.
- Gouider, M., Feki, M., & Sayadi, S. (2010). Bioassay and use in irrigation of untreated and treated wastewaters from phosphate fertilizer industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 932-938.
- Harmsen, J. (2007). Measuring Bioavailability : From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality*, 36(5), 1420-1428.
- Hassan, S. H. A., & Oh, S. E. (2010). Improved detection of toxic chemicals by *Photobacterium phosphoreum* using modified Boss medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(1), 16-21.
- Hassler, C. S., Slaveykova, V. I., & Wilkinson, K. J. (2004). Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 283-291.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 298-309.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.-C., & Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7), 1308-1316.
- Hermens, J., Busser, F., Leeuwangh, P., & Musch, A. (1985). Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Photobacterium phosphoreum* : The Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9(1), 17-25.
- Hernando, M. D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M. J., & Fernández-Alba, A. R. (2007). Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*, 68(4), 724-730.
- Hirrmann, D., Loibner, A. P., Braun, R., & Szolar, O. H. J. (2007). Applicability of the bioluminescence inhibition test in the 96-well microplate format for PAH-solutions and elutriates of PAH-contaminated soils. *Chemosphere*, 67(6), 1236-1242.
- Hsieh, C.-Y., Tsai, M.-H., Ryan, D. K., & Pancorbo, O. C. (2004). Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment*, 320(1), 37-50.

- Huang, C.-W., Yang, S.-H., Sun, M.-W., & Liao, V. H.-C. (2015). Development of a set of bacterial biosensors for simultaneously detecting arsenic and mercury in groundwater. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 10206-10213.
- Hund-Rinke, K., & Kördel, W. (2003). Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: Experimental methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 52-62.
- Hurtado-Gallego, J., Pulido-Reyes, G., González-Pleiter, M., & Fernández-Piñas, F. (2019). Luminescent microbial bioassays and microalgal biosensors as tools for environmental toxicity evaluation. In G. Thouand (Éd.), *Handbook of Cell Biosensors* (p. 1-58).
- Hwang, E. T., Ahn, J.-M., Kim, B. C., & Gu, M. B. (2008). Construction of a *nrdA::luxcdabe* fusion and its use in *Escherichia coli* as a DNA damage Biosensor. *Sensors*, 8(2), 2.
- Hynninen, A., Tönismann, K., & Virta, M. (2010). Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals. *Bioengineered Bugs*, 1(2), 132-138.
- Hynninen, A., & Virta, M. (2010). Whole-cell bioreporters for the detection of bioavailable metals. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 118, 31-63.
- Ivask, A., Bondarenko, O., Jepihhina, N., & Kahru, A. (2010). Profiling of the reactive oxygen species-related ecotoxicity of CuO, ZnO, TiO<sub>2</sub>, silver and fullerene nanoparticles using a set of recombinant luminescent *Escherichia coli* strains: Differentiating the impact of particles and solubilised metals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 701-716.
- Ivask, A., Green, T., Polyak, B., Mor, A., Kahru, A., Virta, M., & Marks, R. (2007). Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(7), 1396-1402.
- 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.
- Jørgensen, F., Stephens, P. J., & Knøchel, S. (1995). The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(3), 274-281.
- Pinheiro, J.P., Minor, M., & van Leeuwen, H.P. (2005). Metal speciation dynamics in colloidal ligand dispersions (world). *ACS Publications; American Chemical Society*.
- Jung, Y., Park, C.-B., Kim, Y., Kim, S., Pflugmacher, S., & Baik, S. (2015). Application of multi-species microbial bioassay to assess the effects of engineered nanoparticles in the aquatic environment: potential of a luminous microbial array for toxicity risk assessment (LumiMARA) on testing for surface-coated silver nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 8172-8186.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez, J., Lechuga, M., & Luzón, G. (2008). Evolution of acute toxicity of non-ionic surfactants over the biodegradation process. *Environmental Toxicology II*.
- Kahru, A., Tomson, K., Pall, T., & Külm, I. (1996). Study of toxicity of pesticides using luminescent bacteria photobacterium phosphoreum. *Water Science and Technology*, 33(6), 147-154.



- Katayama, A., Bhula, R., Burns, G. R., Carazo, E., Felsot, A., Hamilton, D., Harris, C., Kim, Y.-H., Kleter, G., Koedel, W., Linders, J., Peijnenburg, J. G. M. W., Sabljic, A., Stephenson, R. G., Racke, D. K., Rubin, B., Tanaka, K., Unsworth, J., & Wauchope, R. D. (2010). Bioavailability of Xenobiotics in the Soil Environment. In D. M. Whitacre (Éd.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (p. 1-86).
- Katsoyiannis, A., & Samara, C. (2007). Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece. *Journal of Hazardous Materials*, 141(3), 614-621.
- Kelly, C. J., Hsiung, C.-J., & Lajoie, C. A. (2003). Kinetic analysis of bacterial bioluminescence. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 370-378.
- Kessenikh, A. G., Novoyatlova, U. S., Bazhenov, S. V., Stepanova, E. A., Khrulnova, S. A., Gnuchikh, E. Y., Kotova, V. Y., Kudryavtseva, A. A., Bermeshev, M. V., & Manukhov, I. V. (2021). Constructing of *bacillus subtilis*-based lux-biosensors with the use of stress-inducible promoters. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 17.
- Khan, S., Brocklehurst, K. R., Jones, G. W., & Morby, A. P. (2002). The functional analysis of directed amino-acid alterations in ZntR from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(3), 438-445.
- Khang, Y.-H., Yang, Z. K., & Burlage, R. S. (1997). Measurement of iron-dependence of pupA Promoter activity by a *pup-lux* bioreporter. 7(5), 352-355.
- Kim, H., Jang, G., & Yoon, Y. (2020). Specific heavy metal/metalloid sensors : Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(3), 907-914.
- Kim, R.-Y., Yoon, J.-K., Kim, T.-S., Yang, J. E., Owens, G., & Kim, K.-R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils : Definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(6), 1041-1061.
- King, J. M., Digrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., Larimer, F., & Saylor, G. S. (1990). Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4970), 778-781.
- Kotova, V. Yu., Manukhov, I. V., & Zavilgelskii, G. B. (2010). Lux-biosensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(8), 781-788.
- Krom, B. P., Warner, J. B., Konings, W. N., & Lolkema, J. S. (2000). Complementary metal ion specificity of the metal-citrate transporters CitM and CitH of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6374-6381.
- Kumpiene, J., Giagnoni, L., Marschner, B., Denys, S., Mench, M., Adriaensen, K., Vangronsveld, J., Puschenreiter, M., & Renella, G. (2017). Assessment of methods for determining bioavailability of trace elements in soils : A Review. *Pedosphere*, 27(3), 389-406.
- Kungolos, A., Hadjispyrou, S., Petala, M., Tsiridis, V., Samaras, P., & Sakellaropoulos, G. P. (2004). Toxic Properties of Metals and Organotin Compounds and Their Interactions on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*, 4(4), 101-110.

- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., & Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(1), 39-47.
- Li, B., Zhang, X., Tefsen, B., & Wells, M. (2022). From speciation to toxicity : Using a “Two-in-One” whole-cell bioreporter approach to assess harmful effects of Cd and Pb. *Water Research*, 217,
- Li, K., Yediler, A., Yang, M., Schulte-Hostede, S., & Wong, M. H. (2008). Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. *Chemosphere*, 72(3), 473-478.
- Lin, J.-W., Chao, Y.-F., & Weng, S.-F. (2001). Riboflavin Synthesis Genes *ribE*, *ribB*, *ribH*, *ribA* Reside in the lux Operon of *Photobacterium leiognathi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(3), 587-595.
- Lisitsa, A. E., Sukovatyi, L. A., Kratasyuk, V. A., & Nemtseva, E. V. (2020). Viscous media slow down the decay of the key intermediate in bacterial bioluminescent reaction. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 492(1), 162-165.
- Ma, M., Wang, C., & Wang, Z. (2005). Assessing toxicities of hydrophobic organic pollutants in Huaihe River by using two types of sampling. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 40(2), 331-342.
- Magrisso, S., Erel, Y., & Belkin, S. (2008). Microbial reporters of metal bioavailability : Microbial reporters of metal bioavailability. *Microbial Biotechnology*, 1(4), 320-330.
- Masner, P., Javůrková, B., & Bláha, L. (2017). Rapid in situ toxicity testing with luminescent bacteria *Photobacterium luminescens* and *Vibrio fischeri* adapted to a small portable luminometer. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(4), 3748-3758.
- Mason, R. P., Reinfelder, J. R., & Morel, F. M. M. (1996). Uptake, toxicity, and trophic transfer of mercury in a coastal diatom. *Environmental Science & Technology*, 30(6), 1835-1845.
- McConkey, B. J., Duxbury, C. L., Dixon, D. G., & Greenberg, B. M. (1997). Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba* : Effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(5), 892-899.
- Meighen, E. A. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological Reviews*, 55(1), 123-142.
- Meighen, E. A. (1993). Bacterial bioluminescence : Organization, regulation, and application of the lux genes. *The FASEB Journal*, 7(11), 1016-1022.
- Meighen, E. A., & Dunlap, P. V. (1993). Physiological, Biochemical and Genetic Control of Bacterial Bioluminescence. In A. H. Rose (Éd.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 34, p. 1-67).
- Mirjani, M., Soleimani, M., & Salari, V. (2021). Toxicity assessment of total petroleum hydrocarbons in aquatic environments using the bioluminescent bacterium *Aliivibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111554.
- Mo, L.-Y., Liu, J., Qin, L.-T., Zeng, H.-H., & Liang, Y.-P. (2017). Two-Stage prediction on effects of mixtures containing phenolic compounds and heavy metals on *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(1), 17-22.

- Mortimer, M., Kasemets, K., Heinlaan, M., Kurvet, I., & Kahru, A. (2008). High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 22(5), 1412-1417.
- Muneer, M., Theurich, J., & Bahnemann, D. (1999). Formation of toxic intermediates upon the photocatalytic degradation of the pesticide diuron. *Research on Chemical Intermediates*, 25(7), 667-683.
- Muneeswaran, T., Kalyanaraman, N., Vennila, T., Rajesh Kannan, M., & Ramakritinan, C. M. (2021). Rapid assessment of heavy metal toxicity using bioluminescent bacteria *Photobacterium leiognathi* strain GoMGm1. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(3), 109.
- Naidu, R., Semple, K. T., Megharaj, M., Juhasz, A. L., Bolan, N. S., Gupta, S. K., Clothier, B. E., & Schulin, R. (2008). Chapter 3 Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. In A. E. Hartemink, A. B. McBratney, & R. Naidu (Éds.), *Developments in Soil Science* (Vol. 32, p. 39-51).
- Nealson, K. H., Eberhard, A., & Hastings, J. W. (1972). Catabolite Repression of Bacterial Bioluminescence: Functional Implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(5), 1073-1076.
- Neamtu, M., Yediler, A., Siminiceanu, I., Macoveanu, M., & Kettrup, A. (2004). Decolorization of disperse red 354 azo dye in water by several oxidation processes—A comparative study. *Dyes and Pigments*, 60(1), 61-68.
- Niazi, J. H., Kim, B. C., & Gu, M. B. (2007). Characterization of superoxide-stress sensing recombinant *Escherichia coli* constructed using promoters for genes *zwf* and *fpr* fused to *lux* operon. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1276-1283.
- Nijvipakul, S., Wongratana, J., Suadee, C., Entsch, B., Ballou, D. P., & Chaiyen, P. (2008). LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1531-1538.
- Nohava, M., Vogel, W. R., & Gaugitsch, H. (1995). Evaluation of the luminescent bacteria bioassay for the estimation of the toxicological potential of effluent water samples—Comparison with data from chemical analyses. *Environment International*, 21(1), 33-37.
- Nuzzo, A., Hosseinkhani, B., Boon, N., Zanaroli, G., & Fava, F. (2017). Impact of bio-palladium nanoparticles (bio-Pd NPs) on the activity and structure of a marine microbial community. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 220(Pt B), 1068-1078.
- Ocampo-Duque, W., Sierra, J., Ferré-Huguet, N., Schuhmacher, M., & Domingo, J. L. (2008). Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 72(5), 715-721.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H. J. C., Pastor, D., & Bleeker, E. a. J. (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 119(2), 195-202.

- Pagnout, C., Présent, R. M., Billard, P., Rotureau, E., & Duval, J. F. L. (2018). What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 270, 482-491.
- Papadopoulou, D., & Samara, C. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination and LUMISTox solvent extract toxicity of marine sediments in the North Aegean Sea, Greece. *Environmental Toxicology*, 17(6), 556-566.
- Peijnenburg, W. J. G. M., & Jager, T. (2003). Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals : Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 63-77.
- Peijnenburg, W. J. G. M., Posthuma, L., Eijsackers, H. J. P., & Allen, H. E. (1997). A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37(2), 163-172.
- Pereira, R., Rocha-Santos, T. a. P., Antunes, F. E., Rasteiro, M. G., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Soares, A. M. V. M., & Lopes, I. (2011). Screening evaluation of the ecotoxicity and genotoxicity of soils contaminated with organic and inorganic nanoparticles : The role of ageing. *Journal of Hazardous Materials*, 194, 345-354.
- Pérez, S., Farré, Marinel. la, García, M. J., & Barceló, D. (2001). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge and their contribution to its toxicity in the ToxAlert® 100 bioassay. *Chemosphere*, 45(6), 705-712.
- Pinheiro, J. P., Galceran, J., & Van Leeuwen, H. P. (2004). Metal Speciation Dynamics and Bioavailability : Bulk Depletion Effects. *Environmental Science & Technology*, 38(8), 2397-2405.
- Rathnayake, I. V. N., Megharaj, M., Krishnamurti, G. S. R., Bolan, N. S., & Naidu, R. (2013). Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? *Chemosphere*, 90(3), 1195-1200.
- Rensing, C., & Maier, R. M. (2003). Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 140-147.
- Riether, K., Dollard, M.-A., & Billard, P. (2001). Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5-6), 712-716.
- Ríos, F., Fernández-Arteaga, A., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., & Lechuga, M. (2018). Silica micro- and nanoparticles reduce the toxicity of surfactant solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 353, 436-443.
- Saddoud, A., Abdelkafi, S., & Sayadi, S. (2009). Effects of domestic wastewater toxicity on anaerobic membrane-bioreactor (MBR) performances. *Environmental Technology*, 30(13), 1361-1369.
- Sajayan, A., Seghal Kiran, G., Priyadharshini, S., Poulouse, N., & Selvin, J. (2017). Revealing the ability of a novel polysaccharide bioflocculant in bioremediation of heavy metals sensed in a *Vibrio* bioluminescence reporter assay. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 228, 118-127.
- Salizzato, M., Bertato, V., Pavoni, B., Ghirardini, A. V., & Ghetti, P. F. (1998). Sensitivity limits and EC50 values of the *Vibrio fischeri* test for organic micropollutants in natural and spiked extracts from sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 655-661.

- Salizzato, M., Pavoni, B., Volpi Ghirardini, A., & Ghetti, P. F. (1998). Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere*, 36(14), 2949-2968.
- Schmitz, R. P. H., Kretkowski, C., Eisenträger, A., & Dott, W. (1999). Ecotoxicological testing with new kinetic *Photobacterium luminescens* growth and luminescence inhibition assays in microtitration scale. *Chemosphere*, 38(1), 67-78.
- Sciuto, E. L., Coniglio, M. A., Corso, D., van der Meer, J. R., Acerbi, F., Gola, A., & Libertino, S. (2019). Biosensors in monitoring water quality and safety : an example of a miniaturizable whole-cell based sensor for Hg<sup>2+</sup> Optical detection in water. *Water*, 11(10), 1986.
- Serat, W. F., Budinger, F. E., & Mueller, P. K. (1965). Evaluation of biological effects of air pollutants by use of luminescent bacteria. *Journal of Bacteriology*, 90(3), 832-833.
- Serat, W. F., Budinger, F. E., & Mueller, P. K. (1967). Toxicity evaluation of air pollutants by use of luminescent bacteria. *Atmospheric Environment* (1967), 1(1), 21-32.
- Serat, W. F., Kyono, J., & Mueller, P. K. (1969). Measuring the effect of air pollutants on bacterial luminescence : A simplified procedure. *Atmospheric Environment* (1967), 3(3), 303-309.
- Shah, N., & Naseby, D. C. (2014). Bioluminescence-based measurement of viability of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 harbouring plasmid-based lux genes under the control of constitutive promoters. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), 1373-1387.
- Shimada, T., & Tanaka, K. (2016). Use of a bacterial luciferase monitoring system to estimate real-time dynamics of intracellular metabolism in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(19), 5960-5968.
- Shin, H. J. (2011). Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 867-877.
- Sinclair, G. M., Paton, G. I., Meharg, A. A., & Killham, K. (1999). Lux-biosensor assessment of pH effects on microbial sorption and toxicity of chlorophenols. *FEMS Microbiology Letters*, 174(2), 273-278.
- Slaveykova, V. I., Wilkinson, K. J., Slaveykova, V. I., & Wilkinson, K. J. (2005). Predicting the Bioavailability of metals and metal complexes : critical review of the Biotic Ligand Model. *Environmental Chemistry*, 2(1), 9-24.
- Somensi, C. A., Simionatto, E. L., Bertoli, S. L., Wisniewski, A., & Radetski, C. M. (2010). Use of ozone in a pilot-scale plant for textile wastewater pre-treatment : physico-chemical efficiency, degradation by-products identification and environmental toxicity of treated wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), 235-240.
- Sørensen, S. J., Burmølle, M., & Hansen, L. H. (2006). Making bio-sense of toxicity : New developments in whole-cell biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1), 11-16.
- 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.

- Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., Malik, K. A., & van der Meer, J. R. (2003). Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4743-4750.
- Strigul, N., Vaccari, L., Galdun, C., Wazne, M., Liu, X., Christodoulatos, C., & Jasinkiewicz, K. (2009). Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination*, 248(1), 771-782.
- Svartz, G., Papa, M., Gosatti, M., Jordán, M., Soldati, A., Samter, P., Guraya, M. M., Pérez Coll, C., & Perez Catán, S. (2017). Monitoring the ecotoxicity of  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Ni/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanomaterials by means of a battery of bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 200-207.
- Szittner, R., & Meighen, E. (1990). Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(27), 16581-16587.
- Tabib, C. R., Brodl, E., & Macheroux, P. (2017). Evidence for the generation of myristylated FMN by bacterial luciferase : occurrence and generation of myrFMN. *Molecular Microbiology*, 104(6), 1027-1036.
- Tecon, R., Beggah, S., Czechowska, K., Sentchilo, V., Chronopoulou, P.-M., McGenity, T. J., & van der Meer, J. R. (2010). Development of a multistrain bacterial bioreporter platform for the monitoring of hydrocarbon contaminants in marine environments. *Environmental Science & Technology*, 44(3), 1049-1055.
- Tecon, R., & Meer, J. R. van der. (2008). Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(7), 4062.
- Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., & van der Lelie, D. (2001). A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 113(1), 19-26.
- Till, P., Toepel, J., Bühler, B., Mach, R. L., & Mach-Aigner, A. R. (2020). Regulatory systems for gene expression control in cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1977-1991.
- Tinikul, R., Chunthaboon, P., Phonbuppha, J., & Paladkong, T. (2020). Bacterial luciferase : Molecular mechanisms and applications. In *The Enzymes* (Vol. 47, p. 427-455).
- Trang, P. T. K., Berg, M., Viet, P. H., Van Mui, N., & Van Der Meer, J. R. (2005). Bacterial bioassay for rapid and accurate analysis of arsenic in highly variable groundwater samples. *Environmental Science & Technology*, 39(19), 7625-7630.
- Tsiridis, V., Petala, M., Koukiotis, C., & Darakas, E. (2017). Implications of handling practices on the ecotoxic profile of alumina nanoparticles towards the bacteria *Vibrio fischeri*. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 52(1), 15-22.
- Väänänen, K., Leppänen, M. T., Chen, X., & Akkanen, J. (2018). Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems : From science to environmental management. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 430-446.

- Van Dyk, T. K., & Rosson, R. A. (1998). *Photobacterium luminescens luxCDABE* promoter probe vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 102, 85-95.
- Van Dyk, T. K., Smulski, D. R., Reed, T. R., Belkin, S., Vollmer, A. C., & LaRossa, R. A. (1995). Responses to toxicants of an *Escherichia coli* strain carrying a *uspA'::lux* genetic fusion and an *E. coli* strain carrying a *grpE'::lux* fusion are similar. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 4124-4127.
- van Leeuwen, H. P. (1999). Metal speciation dynamics and bioavailability : inert and labile complexes. *Environmental Science & Technology*, 33(21), 3743-3748.
- van Leeuwen, H. P., Buffle, J., Duval, J. F. L., & Town, R. M. (2013). Understanding the Extraordinary Ionic Reactivity of Aqueous Nanoparticles. *Langmuir*, 29(33), 10297-10302. <https://doi.org/10.1021/la401955x>
- van Leeuwen, H. P., Town, R. M., Buffle, J., Cleven, R. F. M. J., Davison, W., Puy, J., van Riemsdijk, W. H., & Sigg, L. (2005). Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 39(22), 8545-8556.
- Vannier, T., Hingamp, P., Turrel, F., Tanet, L., Lescot, M., & Timsit, Y. (2020). Diversity and evolution of bacterial bioluminescence genes in the global ocean. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(2), lqaa018.
- Velzeboer, I., Hendriks, A. J., Ragas, A. M. J., & van de Meent, D. (2008). Nanomaterials in the environment aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1942-1947.
- 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, C., Yediler, A., Lienert, D., Wang, Z., & Kettrup, A. (2002). Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 46(2), 339-344.
- Wang, D., Zhao, L., Ma, H., Zhang, H., & Guo, L.-H. (2017). Quantitative Analysis of Reactive Oxygen Species Photogenerated on Metal Oxide Nanoparticles and their bacteria toxicity : the role of superoxide radicals. *Environmental Science & Technology*, 51(17), 10137-10145.
- Wilkinson, K. J., Bertsch, P. M., Jagoe, C. H., & Campbell, P. G. C. (1993). Surface complexation of aluminum on isolated fish gill cells. *Environmental Science & Technology*, 27(6), 1132-1138.
- Winson, M. K., Swift, S., Hill, P. J., Sims, C. M., Griesmayr, G., Bycroft, B. W., Williams, P., & Stewart, G. S. A. B. (1998). Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiology Letters*, 163(2), 193-202.
- Wolska, L., Kuczyńska, A., & Namieśnik, J. (2006). Quality of groundwater contaminated by leachates from seven Polish landfills – chemical and ecotoxicological classifications. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88(3), 501-513.

- Woutersen, M., Belkin, S., Brouwer, B., van Wezel, A. P., & Heringa, M. B. (2011). Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(4), 915-929.
- Xu, T., Close, D. M., Sayler, G. S., & Ripp, S. (2013). Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment. *Ecological Indicators*, 28, 125-141.
- Ye, Z., Zhao, Q., Zhang, M., & Gao, Y. (2011). Acute toxicity evaluation of explosive wastewater by bacterial bioluminescence assays using a freshwater luminescent bacterium, *Vibrio qinghaiensis sp. Nov.* *Journal of Hazardous Materials*, 186(2), 1351-1354.
- Zabetoglou, K., Voutsas, D., & Samara, C. (2002). Toxicity and heavy metal contamination of surficial sediments from the Bay of Thessaloniki (Northwestern Aegean Sea) Greece. *Chemosphere*, 49(1), 17-26.
- Zhang, J., & Chen, Q. (2014). Predicting the long-term toxicity of five-antibiotic mixtures to *Vibrio qinghaiensis sp. Q67*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5 Suppl), 1605-1609.
- Zhao, C.-M., Campbell, P. G. C., & Wilkinson, K. J. (2016). When are metal complexes bioavailable? *Environmental Chemistry*, 13(3), 425.
- Zhu, Y., Elcin, E., Jiang, M., Li, B., Wang, H., Zhang, X., & Wang, Z. (2022). Use of whole-cell bioreporters to assess bioavailability of contaminants in aquatic systems. *Frontiers in Chemistry*, 10.



## *Chapitre 2. Matériels et méthodes expérimentales*

## 1. Biosenseurs bactériens bioluminescents

### 1.1. Souche hôte utilisée

Les biosenseurs bactériens bioluminescents adoptés dans ces travaux ont été construits à partir de la souche modèle *Escherichia coli* K-12 BW25113 obtenu auprès du Coli Genetic Stock Center de l'Université de Yale (**Baba et al., 2006**). Connue pour son temps de génération très court (17–20 min), sa facilité de culture et son génome entièrement séquencé, cette bactérie est très couramment utilisée pour la construction d'un grand nombre de biosenseurs bactériens.

### 1.2. Plasmides et constructions génétiques

**Les biosenseurs spécifiques** ont été construits par introduction du plasmide pUCD615 *pzntA-luxCDABE* (**Riether et al., 2001**) par choc thermique au  $\text{CaCl}_2$  dans la souche susmentionnée. Ce plasmide porte 2 gènes de résistance aux antibiotiques (kanamycine et ampicilline) ainsi qu'un opéron *luxCDABE* (provenant de *Vibrio fischeri*) sous le contrôle transcriptionnel du promoteur *pzntA* inductible au cadmium mais également au zinc, plomb et mercure (**Binet & Poole, 2000 ; Riether et al., 2001**). Ce promoteur est impliqué dans les mécanismes d'homéostasie/résistance des bactéries aux métaux, notamment dans la transcription du gène *zntA* permettant la synthèse des pompes d'efflux spécifiques. Le choix de ce plasmide a été guidé par des considérations pratiques et opérationnelles. Il a été construit en interne au sein du laboratoire LIEC et a fait l'objet d'une utilisation étendue, nous conférant ainsi une connaissance approfondie sur son fonctionnement.

**Les biosenseurs non spécifiques** ont été construits en introduisant le plasmide pET28 *rrnB P1-luxCDABE* (**Pupov et al., 2018**) par choc thermique au  $\text{CaCl}_2$  dans la souche BW25113 portant un gène de résistance à la kanamycine et l'opéron *luxCDABE* (provenant de *Photobacterium luminescens*) dont l'expression est contrôlée par le promoteur de l'ARN ribosomique *rrnB P1*. Initialement, ce promoteur contrôle l'expression d'un des 7 opérons de l'ARN ribosomique (**Shin et al., 2021**). Il est notamment connu pour répondre aux changements drastiques du milieu (choc thermique ou carence en nutriments) (**Condon et al., 1995 ; Hauryliuk et al., 2015**). Dans ce second cas, il est un marqueur pertinent dans le cadre du premier objectif de cette thèse qui pour rappel consiste à étudier l'influence de la qualité nutritive du milieu sur le métabolisme cellulaire sur la base de signaux temporels de bioluminescence. De plus, le taux de transcription de l'ARN ribosomique, et par conséquent le niveau de synthèse des ribosomes, ainsi que l'efficacité de la traduction étant liés au métabolisme cellulaire (**Tao et al., 1999**), ce promoteur représente un marqueur approprié pour vérifier l'absence d'effets de toxicité liés aux métaux et aux différentes conditions d'exposition. Ce plasmide nous a été gracieusement fourni par Kulbachinskiy A. et Esyunina D. de l'Institut de génétique moléculaire de Moscou.

## 2. Milieux utilisés

Les cultures bactériennes effectuées en amont des essais de bioluminescence ont été réalisées dans le milieu Lysogeny Broth (LB) dont la composition est répertoriée dans le **tableau I**. Les essais de bioluminescence ont quant à eux été effectués dans un milieu minimum, le new glycerol-glycerophosphate medium (nGGM), supplémenté ou non en  $\text{NaNO}_3$  (**tableaux II** et **III** respectivement) (**Riether et al., 2001**). Le choix de ce milieu a été motivé par sa composition chimique, laquelle limite la complexation du Cd(II) et permet d'être dans les conditions les plus simples pour interpréter quantitativement les processus dynamiques qui régissent la distribution du métal de la solution vers la surface des biosenseurs et l'émission de bioluminescence qui en résulte. La complexation du Cd(II) dans le milieu nGGM a été vérifiée par le modèle de calcul de spéciation à l'équilibre Visual Minteq, lequel a démontré que 70% du Cd(II) était sous forme libre.

**Tableau I :** Composition du milieu LB

Composants	Concentrations (g/L)
Peptone de caséine	10
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium	10

**Tableau II :** Composition du milieu nGGM

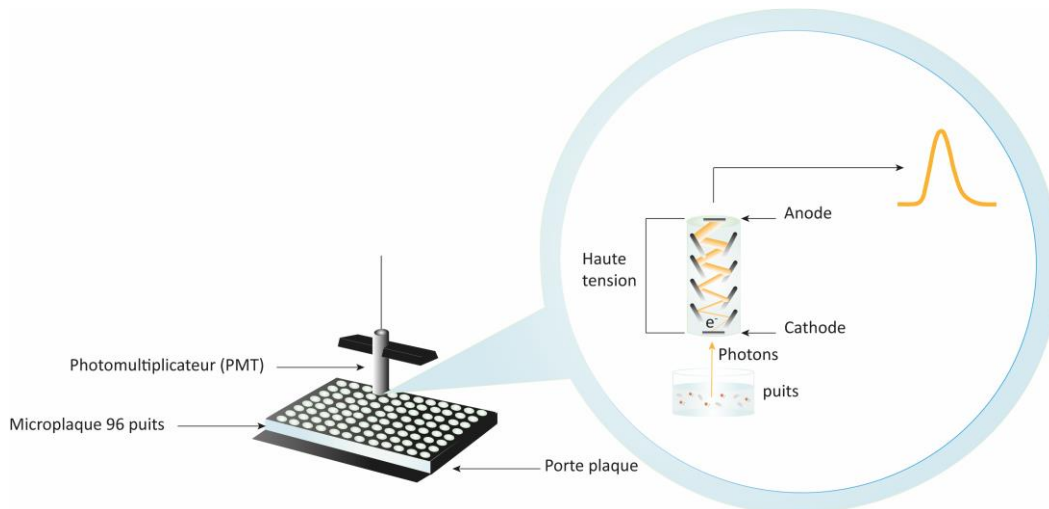
Composants	Concentrations (mM)
MOPS	40
Nitrate d'ammonium	12.5
Nitrate de potassium	10
Sulfate de potassium	5
Chlorure de calcium anhydre	0.144
B-glycerophosphate anhydre	5
Chlorure de magnesium hexahydrate	1
D-(+)-Glucose 20%	0.5
pH	6.8

**Tableau III** : Composition du milieu nGGM-NaNO<sub>3</sub>

<b>Composants</b>	<b>Concentrations (mM)</b>
MOPS	40
Nitrate d'ammonium	12.5
Nitrate de potassium	10
Sulfate de potassium	5
Chlorure de calcium anhydre	0.144
B-glycerophosphate anhydre	5
Chlorure de magnésium hexahydrate	1
D-(+)-Glucose 20%	0.5
Nitrate de sodium	250
pH	6.8

### 3. Luminométrie

Le luminomètre SAFAS Xenius muni d'un lecteur de microplaque est conçu pour détecter et mesurer de faibles quantités de lumière grâce à un photomultiplicateur (PMT) à comptage de photons. Situé au plus près de l'échantillon, ce dernier permet de réduire la perte de photons et de ne pas prendre en compte ceux émis dans les puits adjacents. Plus précisément, les photons émis par les biosenseurs vont percuter une photocathode présente à l'entrée du PMT et générer des électrons. Un champ à haute tension est alors appliqué afin que ces derniers soient accélérés et multipliés au sein d'une chaîne de dynodes jusqu'à atteindre une anode avec une puissance suffisante pour induire une impulsion lisible par le logiciel SP2000 Version 7 (**Fig. 1**).



**Fig. 1 :** Principe de fonctionnement du luminomètre. Chaque puits de la microplaque 96 puits contenant des biosenseurs bactériens bioluminescents et le métal cible à détecter est analysé un par un par le PMT. Lorsque le métal est internalisé par les cellules, les biosenseurs émettent des photons qui vont aller percuter une photocathode présente à l'entrée du PMT et générer des électrons. Un champ à haute tension est alors appliqué afin que ces derniers soient accélérés et multipliés au sein d'une chaîne de dynodes jusqu'à atteindre une anode avec une puissance suffisante pour induire une impulsion lisible. La figure a été en partie générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) et inspiré de <https://www.berthold.com/fr-fr/bio-analyses/base-de-connaissances/glossaire/luminometre/>.

#### 4. Culture bactérienne

Les biosenseurs bactériens spécifiques et non spécifiques répondant respectivement au cadmium et au métabolisme cellulaire, sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Quelques jours avant leur utilisation, ils sont inoculés sur une gélose LB agar contenant  $50\ \mu\text{g/mL}$  d'ampicilline et  $30\ \mu\text{g/mL}$  de kanamycine pour le biosenseur spécifique et seulement  $30\ \mu\text{g/mL}$  de kanamycine pour le biosenseur non spécifique, et incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures avant d'être conservés à  $4^{\circ}\text{C}$ . La mise en culture se fait par introduction d'une colonie isolée dans un Erlenmeyer de 125 mL contenant 20 mL d'un milieu LB (**tableau I**) supplémenté des antibiotiques adéquats, et incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 9 h sous agitation à 160 rpm. Les cellules précultivées ont été utilisées pour inoculer, à une dilution de 1:100, 100 mL d'un milieu LB contenant  $300\ \mu\text{L}$  de kanamycine ( $10\ \text{mg/mL}$ ) et  $100\ \mu\text{L}$  d'ampicilline ( $50\ \text{mg/mL}$ ) pour le biosenseur spécifique et  $300\ \mu\text{L}$  de kanamycine ( $10\ \text{mg/mL}$ ) pour le biosenseur non spécifique. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 16 h à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation à 160 rpm.

## 5. Modulation de la qualité nutritionnelle des milieux : effets sur la bioluminescence

Afin d'évaluer comment la biodisponibilité et la qualité des nutriments influent sur la réponse temporelle du biosenseur, nous avons exploité 2 mécanismes de régulation globale bactériens, à savoir (i) la *réponse stringente* qui pour rappel est associée au passage d'un excès d'acides aminés à un manque. Dans le cas des biosenseurs cela se traduit par l'apparition d'une bimodalité (2 pics). Le premier pic est contrôlé par l'accumulation des acides aminés biodisponibles présents dans le milieu et le deuxième par l'utilisation d'acides aminés auto-synthétisés lorsque les acides aminés présents dans le milieu ne sont plus disponibles. (ii) la *répression catabolique* qui correspond à l'utilisation de la source de carbone la plus rapidement métabolisable et à l'inhibition de la synthèse des enzymes impliquées dans le catabolisme de la source de carbone non préférentiel. Ce n'est que lorsque la source de carbone préférentielle (glucose pour *E. coli*) est totalement épuisée que les bactéries vont induire la synthèse des enzymes nécessaires à la dégradation de la source de carbone secondaire (dans notre cas, le xylose).

Ainsi, des mesures de la réponse temporelle de bioluminescence sur 48 h de 2 biosenseurs, *Escherichia coli zntA-luxCDABE* et *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE*, ont été effectuées dans des milieux de compositions différentes en acides aminés (tryptone ou Lysogénie Broth (LB)) et en sucres (glucose, xylose et leurs mélanges) à des concentrations variables en Cd(II) (0-20 mM). Dans ces conditions d'expérimentation, les effets délétères potentiellement induits par le métal sont sans effet sur la luminescence émise. Ceci a été vérifié par le régime linéaire établi entre les concentrations en Cd(II) et la bioluminescence dans cette gamme de concentrations. Ces expérimentations ont par la suite été confrontées à la formalisation théorique établie par **Duval & Pagnout (2020)** adaptée à la multimodalité observée et aux types de biosenseurs.

La suspension bactérienne de chaque biosenseur préparée **partie 4** de ce chapitre a été subdivisée en 16 aliquots de 5 mL après que la  $DO_{600nm}$  ait été mesurée. Ces 16 aliquots ont été lavés deux fois par centrifugation (7000 g, 3 min) avec le milieu nGGM (**tableau II**) complété par de tryptone (1 % v/v) ou du LB (1 % v/v) comme source d'acides aminés et du glucose et du xylose à différents ratios (100/0, 50/50, 30/70, 20/80, 18/82, 16/84, 14/86, 12/88, 10/90, 6/94, 4/96, 2/98, et 0/100). Les mesures de bioluminescence ont été réalisées dans une microplaque opaque de 96 puits. Les puits ont été remplis avec 70  $\mu$ L d'eau ultrapure milli-Q, 10  $\mu$ L de milieu nGGM-glucose/xylose, 10  $\mu$ L de culture bactérienne et 10  $\mu$ L de  $Cd(NO_3)_2$  pour obtenir une gamme de concentrations finales de Cd(II) de 0 à 20 mM. Ainsi, la concentration en tryptone ou en LB adoptée dans les milieux d'essais de bioluminescence était donc à 0,1 % (v/v), et celle des milieux nGGM-glucose/xylose correspondait à une dilution au 1:5 de la solution de nGGM-glucose/xylose précédemment préparée. Il a été confirmé par marquage des cellules au Syto9 et analyse en cytométrie en flux que la concentration bactérienne

reste constante pendant toute la durée de l'expérimentation (*i.e.* 48 h), afin de garantir qu'il n'y ait pas de variation dans le temps de la concentration cellulaire. La luminescence de chaque puits a été mesurée toutes les 5 min à l'aide du luminomètre SAFAS Xenius, après 10 secondes d'agitation orbitale (3 mm d'amplitude et fréquence de 10 Hz), et ce, sur une durée de 48 h à 25°C.

## 6. Modulation des conditions de spéciation et des conditions de déplétion de métal en solution au cours du temps dans les essais de bioluminescence

Dans le but de comprendre comment la réponse du biosenseur reflète les couplages entre bioaccumulation, biodisponibilité et spéciation des métaux, des mesures de la réponse temporelle de bioluminescence des 2 biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* et *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* ont été effectuées en présence d'une concentration fixe en Cd(II), d'une concentration variable en ligands moléculaires ou particuliers et en cellules.

Les expérimentations ont été réalisées en présence de ligands moléculaires présentant des constantes de stabilité des complexes qu'ils forment avec le Cd(II) différentes, ou en présence de ligands particuliers de tailles et charges électrostatiques variables. Des mesures de bioluminescence ont également été effectuées à une salinité en NaNO<sub>3</sub> équivalente à celle du milieu nGGM, soit 10 mM, ci-après dénommé « basse salinité » pour tous les ligands moléculaires (*i.e.* EDTA, glutathion, acide citrique, histidine et cystéine) et nanoparticulaires testés (voir les **tableaux IV** et **V** présentés ci-dessous).

Des mesures supplémentaires de la réponse temporelle des biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* et *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* ont été effectuées à basse salinité et à une concentration équivalente en NaNO<sub>3</sub> de 200 mM, désignée par la suite comme « haute salinité », en présence seulement d'EDTA ou de cystéine. Cette augmentation de la salinité du milieu vise à éliminer l'effet de l'électrostatique bactérien, autrement dit le champ électrique à l'interface bactérie/solution, qui influence la labilité des complexes métalliques. En effet, selon **Duval et al., (2023)**, l'impact du champ électrique interfacial sur la labilité des complexes métalliques dépend des charges des espèces réactives et de la surface biologique. A titre illustratif, les interactions attractives entre le métal et la surface biologique ont pour conséquence d'augmenter la labilité des complexes métalliques en accélérant le flux de diffusion du métal de la solution vers la biomembrane. Pour ce faire, les biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* et *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* ont été exposés en concentrations variables dans des milieux nGGM supplémentés ou non en NaNO<sub>3</sub> (basse et haute salinité respectivement) en présence de ligands moléculaires et d'une concentration fixe en Cd (non toxique pour les biosenseurs).

A la différence des expérimentations sur l'influence de la qualité nutritive du milieu étudiée dans le **chapitre 3** et **4**, les biosenseurs ont été exposés dans un milieu nGGM sans ajout de milieu LB ou de tryptone. Le changement de milieu (transition du milieu de culture LB au milieu d'exposition nGGM) induit une phase de latence de la souche, ne la rendant opérationnelle qu'au bout de 6 h. C'est pourquoi, un préconditionnement de la souche a été effectué à 25°C pendant 6 h sous agitation dans le milieu d'exposition dépourvu de Cd. Les résultats obtenus seront analysés ultérieurement par un modèle théorique (cf. **Annexe**) qui définissent le couplage des processus dynamiques de spéciation extracellulaire des métaux, leur bioaccumulation et les processus intracellulaires qui conduisent à l'émission de photons.

### *6.1. Ligands utilisés (chélateurs de Cd)*

Pour avoir un large spectre de scénarios de spéciation, 5 ligands moléculaires différents de par la stabilité des complexes qu'ils forment avec le Cd(II) (EDTA, glutathion, cystéine, histidine et acide citrique) et 4 ligands particuliers ci-après dénommés carboxylate modified latex (CML) ont été sélectionnés. Ces CML correspondent à des microsphères de polystyrène chargées négativement avec du sulfate et une haute densité de groupements carboxyles à leur surface. Ils diffèrent en termes de tailles et de charges électrostatiques. Ce choix a été motivé par les travaux récents de **van Leeuwen et al., (2013)** ayant démontré que la labilité (et biodisponibilité) des complexes métaux-nanoparticules dépendaient fortement de la taille et de la charge des particules complexantes (voir **partie 3 - 3.3** du **chapitre I**). Les caractéristiques respectives des ligands moléculaires et particuliers sont référencées **tableau IV** et **V**.



**Tableau IV:** Liste des ligands moléculaires utilisés dans notre étude (unité des constantes de stabilité des complexes monodentates et bidentates formés avec le Cd (1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> chiffre indiqué) : mol<sup>-1</sup> m<sup>3</sup> et (mol<sup>-1</sup> m<sup>3</sup>)<sup>2</sup>, respectivement.

Ligands moléculaires	Constante de stabilité (log K)	Concentrations adoptées dans les travaux
EDTA	18.1	0 - 440 nM
Glutathion	10.18 15.35	0 - 1 Mm
Cystéine	12.88 19.6	0 - 3 µM
Histidine	6.48 11.11	0 - 2 mM
Acide citrique	4.98 5.94	0 - 1 mM

**Tableau V :** Listes des ligands particuliers utilisés dans notre étude (unité de la constante de stabilité des complexes formés avec le Cd : mol<sup>-1</sup> m<sup>3</sup>)

Ligands particuliers	Diamètre moyen (nm) <sup>1</sup>	Diamètre moyen (nm) dans le milieu nGGM <sup>2</sup>	Diamètre moyen (nm) dans le milieu nGGM-NaNO <sub>3</sub> <sup>2</sup>	Constante de stabilité (log K) <sup>3</sup>	Concentrations adoptées dans les travaux
CML	27 ± 10	24 ± 0.7	23 ± 0.6	1.95	0 -1000 mg/L
	37 ± 10	32 ± 1	32 ± 1.5	2.25	0 -1000 mg/L
	60 (50 - 70)	55 ± 0.7	54 ± 1.3	1.88	0 -1000 mg/L
	110 (90 - 150)	94 ± 1.6	94 ± 1.1	2.24	0 -1000 mg/L

<sup>1</sup> Obtenu par microscopie électronique à transmission (données fournisseur)

<sup>2</sup> Obtenu par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

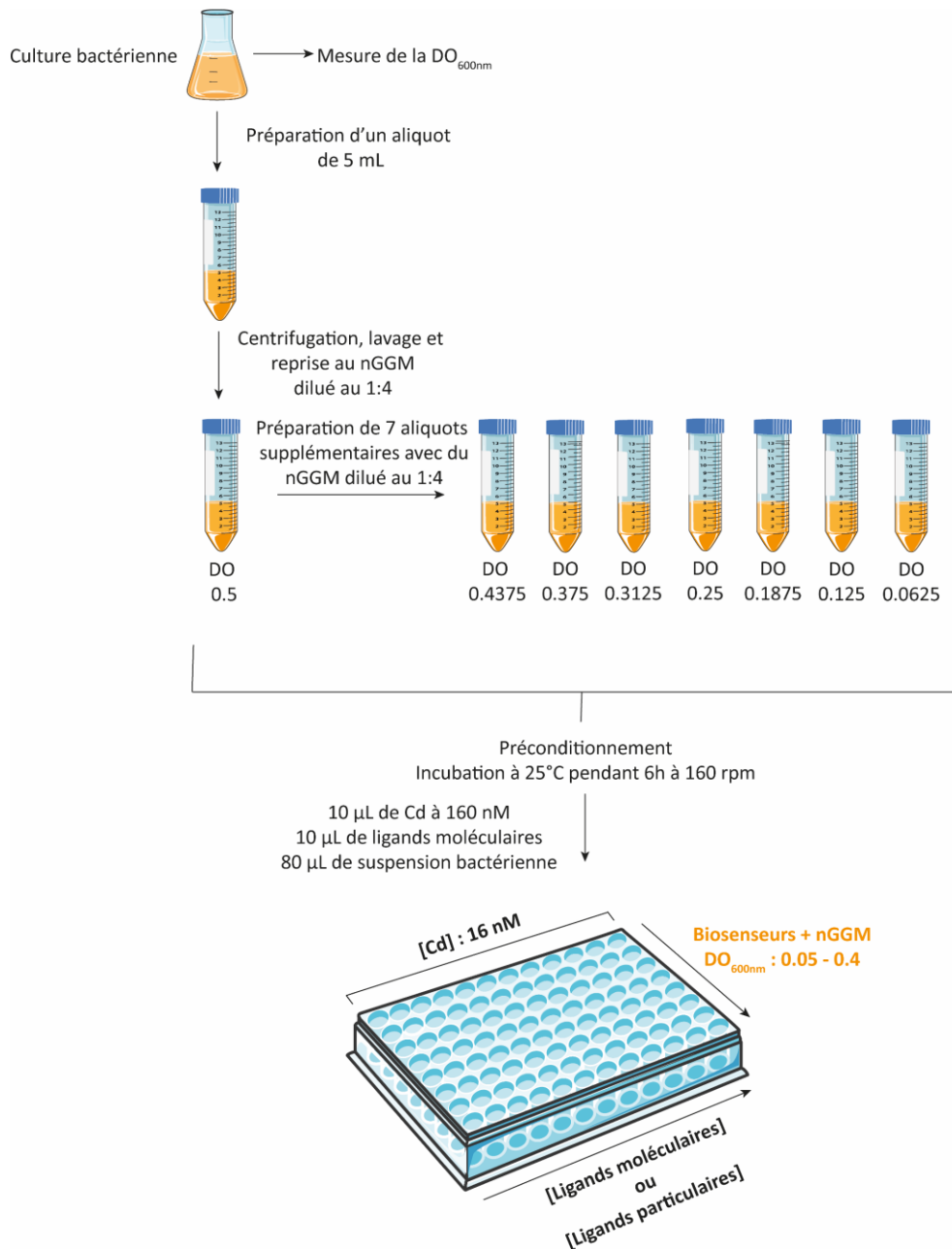
<sup>3</sup> Obtenu par électrochimie

## 6.2. Essais de bioluminescence à basse salinité en présence de ligands moléculaires ou particuliers

Les 2 biosenseurs ont été cultivés suivant la procédure indiquée en **partie 4**.

Les suspensions cellulaires ont été récupérées à une DO<sub>600nm</sub> > 2.8 et un aliquot de 5 mL a été préparé et lavé deux fois par centrifugation (7000 g, 3 min) avec le milieu nGGM (**tableau II**) dilué au 1:4 et ajusté pour obtenir une DO<sub>600nm</sub> de 0.5. De cette suspension, 7 autres aliquots ont été préparés et dilués avec le milieu nGGM dilué au 1:4 afin d'obtenir 8 suspensions à DO<sub>600nm</sub> de 0.0625 ; 0.125 ; 0.1875 ; 0.25 ; 0.3125 ; 0.375 ; 0.4375 et 0.5. Les 8 suspensions ont par la suite été préconditionnées à 25°C pendant 6 h à 160 rpm afin de raccourcir la phase de latence inhérente au changement de milieu et obtenir ainsi un signal luminescent permettant d'observer des effets sur la spéciation du métal dès les premières minutes d'exposition. Les mesures de bioluminescence ont été réalisées dans une microplaque

opaque de 96 puits avec luminomètre SAFAS Xenius. Les puits ont été remplis avec 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  à 160 nM, 10  $\mu\text{L}$  de ligands moléculaire ou particuliers de concentrations variables et 80  $\mu\text{L}$  de culture bactérienne. Ainsi, la concentration en Cd(II) fixe adoptée dans les milieux d'essais de bioluminescence était de 16 nM et celle du milieu nGGM correspondait à une dilution au 1:5 de la solution de nGGM précédemment préparée. La concentration cellulaire correspond quant à elle à une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.05 ; 0.1 ; 0.15 ; 0.20 ; 0.25 ; 0.30 ; 0.35 et 0.4 et celle des ligands moléculaires et particuliers aux concentrations répertoriées respectivement dans les **tableaux IV** et **V** respectivement. Les mesures de bioluminescence ont été effectuées toutes les 5 min, après agitation orbitale (10 sec, 3 mm d'amplitude et fréquence de 10 Hz) à 25°C pendant 24 ou 48 h selon le biosenseur analysé. Une représentation schématique du protocole est donnée en **Fig. 2**.

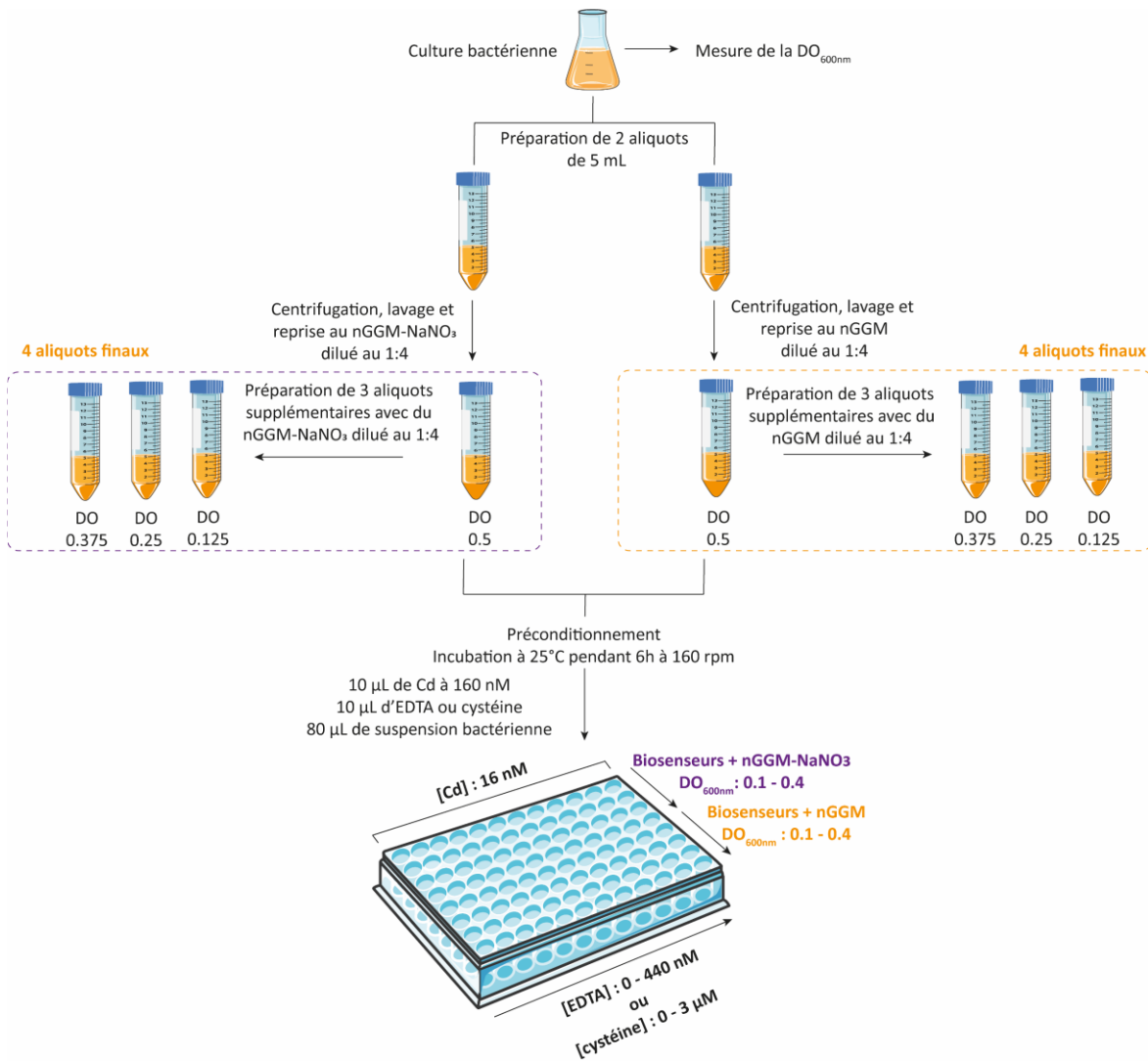


**Fig. 2** : Essais de bioluminescence à basse salinité en présence de ligands moléculaires ou particulaires. La figure a été en partie générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

### 6.3. Essais de bioluminescence à haute et basse salinité en présence de ligands moléculaires

Les 2 biosenseurs ont été cultivés suivant la procédure indiquée en **partie 4**.

Les suspensions bactériennes de chaque biosenseur ont été récupérées à une  $DO_{600nm} > 2.8$  et 2 aliquots de 5 mL ont été préparés et lavés deux fois par centrifugation (7000 g, 3 min) avec un milieu nGGM- $NaNO_3$  (**tableau III**) ou un milieu nGGM (**tableau II**), tous deux dilués au 1:4, puis ajustés à une  $DO_{600nm}$  de 0,5. A partir de chacune des suspensions, 3 autres aliquots ont été préparés et dilués avec du milieu nGGM- $NaNO_3$  ou nGGM dilué au 1:4 pour obtenir au total 4 suspensions avec des  $DO_{600nm}$  de 0.125 ; 0.25 ; 0.375 et 0.5. Les suspensions ont ensuite été incubées à 25°C pendant 6 h à 160 rpm. Les mesures de bioluminescence ont été réalisées dans une microplaque opaque de 96 puits avec un luminomètre SAFAS Xenius. Les puits ont été remplis avec 10  $\mu$ L de  $Cd(NO_3)_2$  à 160 nM, 10  $\mu$ L de solution d'EDTA ou de cystéine de concentrations variables (**tableau IV**) et 80  $\mu$ L de culture bactérienne préparée comme décrit ci-dessus. Ainsi, la concentration fixe de Cd(II) adoptée dans les milieux de test de bioluminescence était de 16 nM et celle des milieux nGGM et nGGM- $NaNO_3$  correspondait à une dilution 1:5 de la solution de nGGM et nGGM- $NaNO_3$  préparée (partie II de ce chapitre, **tableau II et III**). La concentration cellulaire finale correspondait à une  $DO_{600nm}$  de 0.1, 0.2, 0.3 et 0.4 et les concentrations d'EDTA et de cystéine aux concentrations répertoriées dans le **tableau IV**. Les mesures de bioluminescence ont été effectuées toutes les 5 min, après agitation orbitale (10 sec, 3 mm d'amplitude et fréquence de 10 Hz) à 25°C pendant 24 ou 48 h selon le biosenseur analysé. Une représentation schématique du protocole est donnée en **Fig. 3**.



**Fig. 3 :** Essais de bioluminescence à haute et basse salinité en présence de ligands moléculaires (EDTA et cystéine). La figure a été en partie générée à l'aide de Servier Medical Art, fourni par Servier, sous licence Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 7. Caractérisation physicochimique des ligands particuliers (chélateurs de Cd)

Afin de pouvoir interpréter quantitativement (ce qui se fera après ma thèse) les données issues des essais de bioluminescence au moyen d'un modèle théorique, il est nécessaire de caractériser la taille et les charges électrostatiques des complexes métalliques nanoparticulaires. Comme cela a été discuté dans le chapitre 1, les propriétés physicochimiques des ligands nanoparticulaires (*i.e.* taille, structure (molle ou dure), nature et densité des charges) exercent une influence considérable sur les interactions avec le métal. La chémodynamique des complexes métal/ligand nanoparticulaires (*i.e.* transfert des métaux de la solution vers la nanoparticule et formation du complexe) et leur labilité sont largement déterminées par des facteurs tels que la taille des particules, la nature des ions métalliques et la charge électrostatique portée par ces particules. En particulier, le transport qui selon la taille et la charge électrostatique est soit régi par la diffusion conductive du métal vers/depuis les particules, soit par la cinétique chimique de formation/dissociation des complexes entre les métaux et les sites réactifs portés par les particules (Duval et al., 2008).

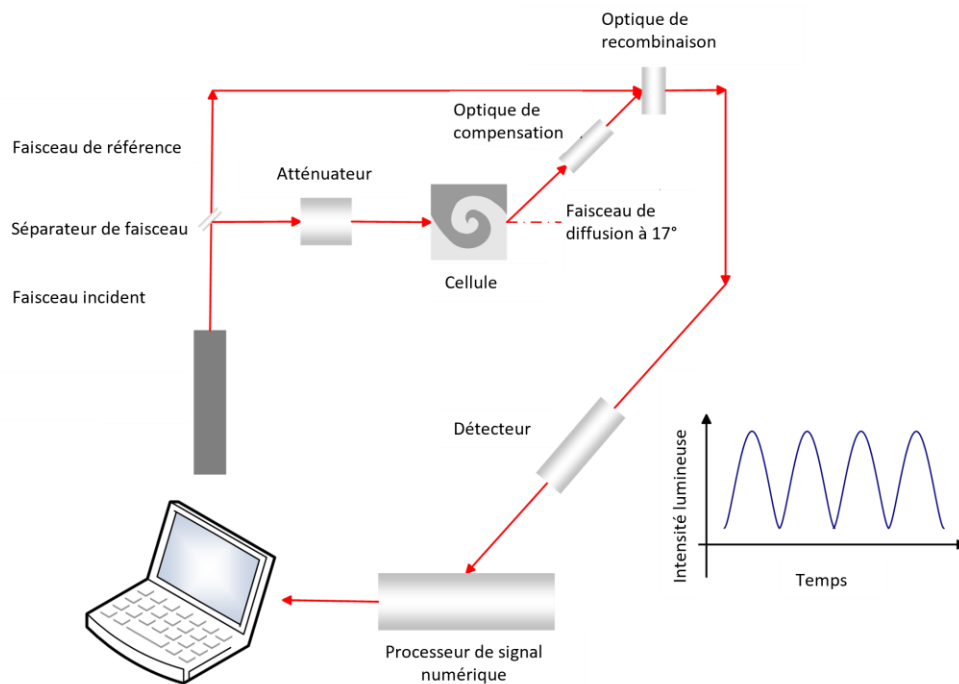
Des mesures de la mobilité électrophorétique et de la taille ont donc été effectuées sur chaque CML par des techniques électrocinétiques *i.e.* microélectrophorèse et par Diffusion Light Scattering (DLS). La mobilité électrophorétique représente le rapport de la vitesse de déplacement de particules dispersées dans un milieu sous l'application d'un champ électrique constant. Cette dernière permet de déterminer selon la théorie de Duval & Ohshima, (2006), la densité de charges dans le cas de particules molles, *i.e.* particules composées d'un cœur dur entouré d'une structure polymérique définie par une distribution 3D des charges, ou le potentiel zêta dans le cas des particules dures (*i.e.* cœur dur avec une distribution 2D des charges) par application *e.g.* de la théorie de Smoluchowsk. Je ne détaillerai pas ici les tenants et aboutissants de ces différents modèles électrocinétiques (*i.e.* électrohydrodynamiques) des interfaces molles et dures ainsi que leurs domaines respectifs d'applicabilité (*e.g.* inapplicabilité du concept de potentiel zêta pour les interfaces molles (Gopmandal & Duval, 2022)).

### 7.1. Mesure de la mobilité électrophorétique des ligands particuliers par microélectrophorèse

La mobilité électrophorétique des 4 CML a été mesurée à pH 6.8 dans des solutions contenant du milieu nGGM (Tableau II) dilué au 1 :5 supplémenté avec 40 mg/L de CML et une concentration équivalente en NaNO<sub>3</sub> (1M) (*i.e.* la concentration NaNO<sub>3</sub> dont la conductivité est équivalente à celle du milieu nGGM dilué) allant de 10 à 400 mM. Elle a également été mesurée dans une solution exclusivement composée de NaNO<sub>3</sub> aux mêmes concentrations (*i.e.* 10 – 400 mM). Ces essais ont été

effectués sans ajout de Cd(II) en raison de sa concentration négligeable (*i.e.* 16 nM) par rapport aux concentrations équivalentes en NaNO<sub>3</sub> adoptées dans ces essais.

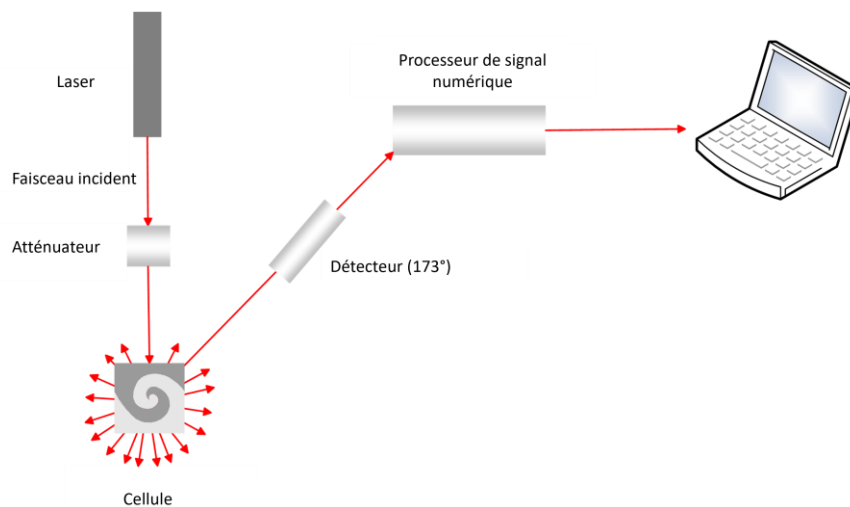
Les mesures ont été effectuées dans des cellules DTS1060 par application d'un courant constant à l'aide du Zetasizer NanoZS (Malvern). Cet appareil associe 2 méthodes, l'analyse de phase de la lumière diffusée (APLD) et la vélocimétrie laser à effet doppler. Brièvement, les particules mises en mouvement par application d'un courant continu sont éclairées par un laser néon-argon (Ne-Ar) ( $\lambda_{633\text{nm}}$ ). La lumière diffusée à un angle de 17° est combinée à un faisceau de référence pour produire un signal d'intensité fluctuant proportionnel à la vitesse des particules. Un processeur de signal est utilisé pour extraire les fréquences caractéristiques de la lumière dispersée. Pour s'affranchir des phénomènes d'électro-osmose (mesure au plan stationnaire), la technique consiste à la fois en une Inversion Lente du Champ (ILC) qui évite la polarisation des électrodes et en une Inversion Rapide du Champ (IRC) qui minimise l'électro-osmose (**Fig. 4**). Ces mesures ont été reproduites en triplicat et seront confrontées ultérieurement à la théorie de **Duval & Ohshima, 2006** sur l'électrophorèse des particules molles, ce qui permettra de déterminer la charge, la densité de charge et la perméabilité hydrodynamique.



**Fig. 4 :** Principe de fonctionnement du Zetasizer NanoZS pour la mesure de la mobilité électrophorétique de particules (d'après Malvern).

## 7.2. Mesure de la taille des ligands particulaires par Diffusion de la Lumière

Bien que la taille des particules ait été donnée par le fournisseur, il a été nécessaire de les mesurer de nouveau afin de bien vérifier leur comportement (*e.g.* l'agrégation, laquelle joue sur la taille des particules) dans le milieu d'exposition (*i.e.* nGGM). Les mesures de taille des CML ont donc été réalisées par DLS à l'aide du Zetasizer NanoZS (Malvern). Cette technique consiste à éclairer des particules dispersées dans un milieu aqueux à l'aide d'un laser (Ne-Ar) afin de mesurer l'intensité de la lumière diffusée par ces particules à un angle de  $173^\circ$ , ceci permettant de limiter les risques de diffusions multiples. Le logiciel DTS du Zetasizer fournit une distribution en intensité qui est par la suite convertie en une distribution en volume puis en nombre (**Fig. 5**). Les mesures de taille ont été effectuées en parallèle des mesures de mobilité électrophorétique pour vérifier que la taille n'augmente pas avec l'augmentation de la concentration équivalente en  $\text{NaNO}_3$  (dus à des possible effets d'agrégation produits par écrantage des interactions électrostatiques interparticulaires) mais également dans des conditions identiques à celles des essais de bioluminescence, à savoir à des concentrations allant de 50 mg/L à 1 g/L afin de vérifier l'absence d'agrégation des CML.



**Fig. 5** : Principe de fonctionnement du Zetasizer NanoZS pour la mesure de la taille (d'après Malvern).



## Références bibliographiques

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants : The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1).
- Binet, M. R., & Poole, R. K. (2000). Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 473(1), 67-70.
- Condon, C., Squires, C., & Squires, C. L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 59(4), 623-645.
- Duval, J. F. L., & Ohshima, H. (2006). Electrophoresis of Diffuse Soft Particles. *Langmuir*, 22(8), 3533-3546.
- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2020). Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters : Experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127751.
- Duval, J. F. L., van Leeuwen, H. P., & Town, R. M. (2023). Electrostatic effects on ligand-assisted transfer of metals to (bio)accumulating interfaces and metal complexes (bioavai)lability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 658, 130679.
- Gopmandal, P. P., & Duval, J. F. L. (2022). Electrostatics and electrophoresis of engineered nanoparticles and particulate environmental contaminants : Beyond zeta potential-based formulation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 60, 101605.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 298-309.
- Pupov, D., Petushkov, I., Esyunina, D., Murakami, K. S., & Kulbachinskiy, A. (2018). Region 3.2 of the  $\sigma$  factor controls the stability of rRNA promoter complexes and potentiates their repression by DksA. *Nucleic Acids Research*, 46(21), 11477-11487.
- Riether, K., Dollard, M.-A., & Billard, P. (2001). Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* *zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5-6), 712-716.
- Shin, Y., Qayyum, M., Pupov, D., Esyunina, D., Kulbachinskiy, A., & Murakami, K. (2021). Structural basis of ribosomal RNA transcription regulation. *Nature Communications*, 12, 528.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., & Conway, T. (1999). Functional Genomics : Expression Analysis of *Escherichia coli* Growing on Minimal and Rich Media. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6425-6440.
- van Leeuwen, H. P., Buffle, J., Duval, J. F. L., & Town, R. M. (2013). Understanding the Extraordinary Ionic Reactivity of Aqueous Nanoparticles. *Langmuir*, 29(33), 10297-10302.

*Chapitre 3. Influence de la biodisponibilité et de la qualité des nutriments sur le signal temporel de bioluminescence : cas des biosenseurs spécifiques inductibles au Cd*

Les méthodes physico-chimiques communément employées pour détecter et quantifier les métaux lourds dans les systèmes aquatiques se heurtent souvent à des difficultés liées à la complexité des protocoles de préparation des échantillons, aux coûts parfois élevés des analyses, ou à leur incapacité à évaluer la fraction biodisponible de métaux, un élément pourtant essentiel pour l'évaluation des effets de toxicité sur les organismes. Au cours des dernières décennies, le développement et l'exploitation de biosenseurs bactériens bioluminescents en vue de la détection de métaux ont émergé comme une solution prometteuse permettant de contourner les restrictions inhérentes aux méthodes physico-chimiques traditionnelles. Ces biosenseurs correspondent à des bactéries génétiquement modifiées capables de synthétiser une protéine (*i.e.* luciférase) et de générer un signal mesurable (*i.e.* bioluminescence) en réponse à l'internalisation d'ions métalliques biodisponibles.

En dépit de leurs avantages indéniables (*i.e.* organisme vivant, réponse rapide et sensible, mesure semi-continue sur plusieurs heures, aucun ajout de substrats), relativement peu de biosenseurs bactériens bioluminescents ont été utilisés pour la surveillance des métaux *in situ*. Ceci est dû à la nature complexe et multifactorielle de la réponse du biosenseur qui rend difficile une interprétation mécanistique et quantitative du signal de bioluminescence. En particulier, la compréhension de ces signaux requière une prise en compte des dimensions physiques, chimiques et biologiques de la réponse, lesquelles dimensions contrôlent la distribution et la partition des ions métalliques à l'interface biosenseur/solution et la production de bioluminescence qui en résulte. En d'autres termes, les difficultés incluent l'évaluation (i) de la biodisponibilité des espèces métalliques dans le milieu extracellulaire, (ii) du flux de bioaccumulation des métaux à la surface du biosenseur, et (iii) de la cinétique des réactions biochimiques intracellulaires conduisant à l'émission de photons. Les aspects (i) et (ii) sont fonction de la spéciation des métaux dans le milieu, *i.e.* de la forme chimique sous laquelle le métal se trouve dans le milieu (forme libre ou complexée). L'évaluation générique de la biodisponibilité/spéciation des métaux nécessite de prendre en compte les processus dynamiques qui contrôlent le transfert réactif des espèces métalliques depuis la solution jusqu'à la surface des cellules (*i.e.* les cinétiques d'association et de dissociation du métal avec les ligands moléculaires et/ou particuliers, et les coefficients de diffusion du métal libre ou complexé), ainsi que leur couplage cinétique avec les processus de bioadsorption et de bioaccumulation. L'ensemble de ces mécanismes définissent *in fine* la labilité des espèces métalliques complexées, c'est-à-dire leur capacité à se dissocier au voisinage de la surface du biosenseur et à contribuer aux flux de bioaccumulation de métaux.

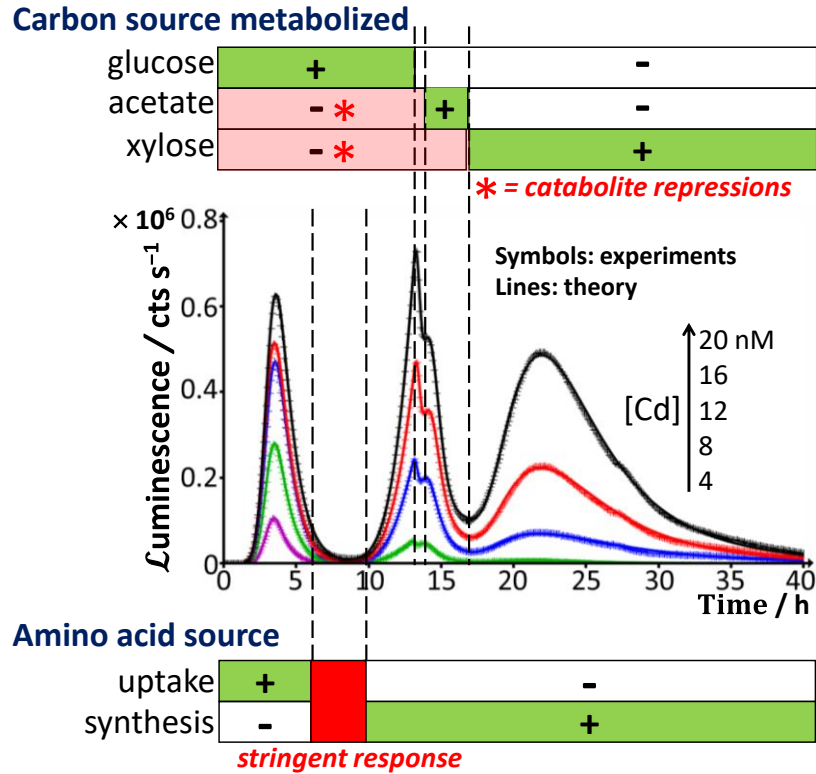
La bioluminescence est non seulement influencée par les processus susmentionnés, mais également par la qualité nutritionnelle du milieu. Cette dernière est essentielle pour assurer les fonctions métaboliques requises pour le maintien de la viabilité cellulaire et également pour produire la bioluminescence (*i.e.* efficacité de la transcription des gènes rapporteurs *lux*, cinétique de production de

la protéine rapporteuse – la luciférase). Cette demande énergétique peut être plus ou moins satisfaite en fonction de la biodisponibilité des nutriments, de la concentration cellulaire et de la complexation des nutriments en solution ou de leur adsorption sur des particules abiotiques.

Bien qu'il y ait de nombreuses études empiriques corrélant biodisponibilité des métaux et bioluminescence via l'utilisation de courbes de calibration, seules quelques études ont abordé la manière dont la qualité des nutriments influence sur la réponse temporelle du biosenseur. En particulier, **Duval & Pagnout, (2019, 2020)** ont établi un formalisme démontrant que la bioluminescence générée par les *E. coli zntA-luxCDABE* inductibles aux métaux n'était pas linéairement corrélée à la photoactivité cellulaire (capacité globale du biosenseur à produire de la lumière) mais à un produit de convolution qui implique des termes relatifs à la dynamique de transfert du métal (biodisponible) depuis la solution jusqu'à la surface du biosenseur et à la cinétique d'émission de photons après internalisation du métal. Par ailleurs, ces auteurs ont mis en évidence qu'une augmentation de la concentration en acides aminés dans la solution (à concentration cellulaire totale constante dans le temps) entraîne le passage d'un signal monomodal (1 pic) à bimodal (2 pics) dû à un mécanisme de régulation globale appelé *réponse stringente*. Cette réponse est associée à l'utilisation d'acides aminés auto-synthétisés par les cellules pour faire face à la carence en acides aminés biodisponibles dans la solution après la première émission de bioluminescence.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est d'élargir le cadre conceptuel établi par **Duval & Pagnout, (2020)** en exploitant 2 mécanismes de régulation globale permettant aux bactéries de s'adapter rapidement à un changement de leur milieu environnant. A savoir : (i) La *réponse stringente* évoquée ci-dessus, et (ii) la *répression catabolique*, *i.e.* l'utilisation préférentielle d'un sucre facilement dégradable lorsque plusieurs autres sucres sont présents dans le milieu et l'induction d'enzymes permettant la dégradation d'un autre sucre lorsque le premier vient à manquer. Ainsi, nous avons étudié la réponse temporelle de bioluminescence du biosenseur *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductible au Cd(II) sur 48 h, dans des milieux qui diffèrent selon la source d'acides aminés (tryptone ou Lysogeny Broth (LB)) et de carbone (glucose, xylose et leurs mélanges) et à des concentrations variables en Cd(II) (0-20 nM). Nous montrons que le couplage entre réponse stringente et répression catabolique médiés par le glucose et le xylose conduit à des signaux multimodaux de bioluminescence, *i.e.* à l'apparition successive de plusieurs pics au cours du temps. La modulation de ce couplage, réalisée en ajustant les concentrations en acides aminés (ainsi que leur source) et les concentrations en glucose et xylose, permet de définir de manière précise le nombre de pics (*i.e.* signal mono, bi, tri ou même quadri-modal) dont les hauteurs respectives sont proportionnelles à la concentration totale de Cd en solution. Les modulations des signaux incluent également un délai d'apparition et une variation de leurs forme et amplitudes. Par exemple, nous démontrons que la répression catabolique du glucose sur le xylose est

caractérisée par une chute abrupte du signal qui est liée à la carence en glucose suivie de l'apparition d'une nouvelle émission de bioluminescence associée à la synthèse des enzymes nécessaires à l'utilisation du xylose. Les différents pics observés et l'analyse de leurs caractéristiques (forme, troncation, amplitude, délai d'apparition) permettent ainsi d'apprécier les voies métaboliques mises en jeu et leurs cinétiques d'activation (**Fig. 1**). De plus, en nous appuyant sur la récente théorie de **Duval & Pagnout, (2020)**, nous sommes parvenus à reconstruire avec succès les signaux de bioluminescence pour toutes les conditions examinées. Le formalisme théorique a notamment mis en évidence que la modulation de la bioluminescence ne résultait pas seulement de la biodisponibilité/qualité des nutriments mais d'un effet combiné de cette dernière avec la biodisponibilité/spéciation des métaux. En outre, cette analyse a permis d'évaluer la photoactivité cellulaire en fonction du temps (évaluée à partir du traitement théorique des signaux via leur déconvolution dans le temps) et de démontrer que ce paramètre est un proxy pertinent pour sonder/détecter des effets de stress et des changements de régimes métaboliques des biosenseurs bactériens luminescents.



**Fig. 1** : Correspondance entre la réponse temporelle de la bioluminescence mesurée avec le biosenseur *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inducible au Cd et les processus métaboliques mis en jeu. Illustration avec le cas d’une condition nutritive examinée correspondant à un milieu nGGM  $x=0.16$  avec  $x = [Glu]/([Glu]+[Xyl])$  supplémenté avec 0.1% de tryptone et une concentration variable en Cd(II) (spécifiée). L’échelle de concentration en cadmium (flèche) correspond au code couleur spécifié. Les symboles correspondent aux différents points de mesures et les lignes pleines au formalisme théorique appliqué aux mesures de bioluminescence. La première émission de luminescence (pic P1) est contrôlée par l’absorption des acides aminés biodisponibles dans le milieu (et apporté par le tryptone) et par la présence de glucose. Lorsqu’il y a carence en acides aminés, les biosenseurs produisent des alarmes (p)ppGpp, ce qui va permettre de réallouer les ressources énergétiques et permettre la synthèse de nouveaux acides aminés ainsi qu’une nouvelle émission de bioluminescence (apparition du pic P2). C’est la réponse stringente. Le pic P2 contrôlé par la présence de glucose et d’acides aminés synthétisés apparaît tronqué. Cette troncature correspond à la carence en glucose. L’apparition d’un épaulement sur le pic P2 à la suite de la troncature correspond à l’utilisation transitoire de l’acétate accumulé dans le milieu suite à la carence en glucose. Lorsque l’acétate est lui aussi épuisé, une nouvelle répression catabolique apparaît (acétate/xylose) entraînant une nouvelle émission de bioluminescence (pic P3). Ce dernier correspond à l’utilisation du xylose.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont été publiés en 2022 dans la revue *Biosensors*.

Exploiting catabolite repression and stringent response to control delay and multimodality of bioluminescence signal by metal whole-cell biosensors: interplay between metal bioavailability and nutritional medium conditions. Delatour, E. ; Pagnout, C. ; Zaffino, M. and Duval, J.F.L. *Biosensors* **2022**, 12, 327 (DOI :10.3390/bios12050327).

### ***Références bibliographiques :***

- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2019). Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting whole-cell bacterial sensors. *ACS Sensors*, 4(5), 1373-1383.
- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2020). Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters : experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127751.

## Article

# Exploiting Catabolite Repression and Stringent Response to Control Delay and Multimodality of Bioluminescence Signal by Metal Whole-Cell Biosensors: Interplay between Metal Bioavailability and Nutritional Medium Conditions

Eva Delatour <sup>1</sup>, Christophe Pagnout <sup>1</sup>, Marie Zaffino <sup>1</sup> and Jérôme F. L. Duval <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, F-57070 Metz, France; eva.delatour@univ-lorraine.fr (E.D.); christophe.pagnout@univ-lorraine.fr (C.P.); marie-laure.zaffino@univ-lorraine.fr (M.Z.)

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, UMR7360, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\* Correspondence: jerome.duval@univ-lorraine.fr

**Abstract:** The time-dependent response of metal-detecting whole-cell luminescent bacterial sensors is impacted by metal speciation/bioavailability in solution. The comprehensive understanding of such connections requires the consideration of the bacterial energy metabolism at stake and the effects of supplied food on cells' capability to convert bioaccumulated metals into light. Accordingly, we investigated the time response (48 h assay) of PzntA-luxCDABE *Escherichia coli* Cd biosensors in media differing with respect to sources of amino acids (tryptone or Lysogeny Broth) and carbon (glucose, xylose and mixtures thereof). We show that the resulting coupling between the stringent cell response and glucose/xylose-mediated catabolite repressions lead to well-defined multimodalities and shapes of the bioluminescence signal over time. Based on a recent theory for the time-response of metal-sensing luminescent bacteria, successful theoretical reconstructions of the bioluminescence signals are reported under all Cd concentrations (0–20 nM) and nutritive conditions examined. This analysis leads to the evaluation of time-dependent cell photoactivity and qualitative information on metal speciation/bioavailability in solution. Biosensor performance and the position, shape, number, and magnitude of detected peaks are discussed in relation to the metabolic pathways operative during the successive light emission modes identified here over time. Altogether, the results clarify the contributions of metal/nutrient bio-availabilities and food quality to cell response typology.

**Keywords:** bioluminescence; whole-cell biosensors; metals; bioavailability; medium nutritional quality; signal dependence on time



**Citation:** Delatour, E.; Pagnout, C.; Zaffino, M.; Duval, J.F.L. Exploiting Catabolite Repression and Stringent Response to Control Delay and Multimodality of Bioluminescence Signal by Metal Whole-Cell Biosensors: Interplay between Metal Bioavailability and Nutritional Medium Conditions. *Biosensors* **2022**, *12*, 327. <https://doi.org/10.3390/bios12050327>

Received: 23 April 2022

Accepted: 10 May 2022

Published: 11 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Due to anthropogenic activities, heavy metals are ubiquitous contaminants in aquatic environments. Given their persistence and potential toxicity towards (micro)organisms, accurate (bio)analytical tools are required to detect metallic contaminants, measure their concentration and elaborate the reliable diagnosis of pollution levels. The monitoring of heavy metals in environmental samples can be performed with, e.g., electrochemical or spectroscopic methods [1,2]. The latter, however, often call for complex sample extraction protocols, are generally costly, and remain difficult to run on a routine basis for on-site measurements [3]. Most importantly, these methods rarely discriminate between bioavailable and total metal fractions in solution, a distinction that is mandatory for the proper assessment of metal-induced toxicity on biota [4].

In the past few decades, the use of whole-cell bacterial sensors for metal detection has proven to be an elegant alternative that overcomes the limitations of traditional physicochemical metal-dosing methods. These sensors are genetically-modified bacteria that



produce a measurable signal (e.g., an electrochemical current or light) after they bioaccumulate metal ions from an aqueous sample [5]. Metal sensing by bacteria exploits common cell homeostasis and resistance strategies, i.e., the MerR family of metal-triggered transcriptional regulators [6]. These regulatory elements include a stress-response promoter activated after the specific binding of a given target metal to a regulatory protein, which subsequently leads to the expression of a reporter gene (i.e., *lux* or *gfp*) fused to the promoter, and to the production of reporter proteins (luciferase and GFP) at the origin of the measured signal (bioluminescence and fluorescence, respectively) [6,7]. Due to their nature as living unicellular organisms, bacterial metal sensors directly experience the bioavailability of metal compounds as they pass through the membrane, exert their effects or are transformed by the cell. They thus provide the easiest and most transparent reduction in the complexity of detecting biological impacts. Unlike a fluorescence response, bioluminescence signals are highly sensitive due to the absence of background contribution, which is attractive for metal monitoring. In addition, the functioning of *lux*-based biosensors does not require the addition of a substrate (e.g., ATP) nor recourse to a laser source for cells to produce light [3,7–9].

Despite these recognized benefits, the mechanistic and quantitative interpretation of the dependence of bioluminescence signals by whole-cell metal reporters on time remains an as-yet poorly resolved issue due to the complexity of the joint physical, chemical, and biological processes that govern the partitioning of metal ions at the biosensor/solution interface and the ensuing cell response. Difficulties include the proper evaluation of the interplay between the (i) bioavailability features of the metal species in the extracellular medium [10–12], (ii) metal biouptake flux at the biosensor surface, and (iii) kinetics of the intracellular biochemical reactions leading to photons emission [13,14]. In particular, items (i) and (ii) depend on the dynamics of metal ion speciation defined by the pertaining rate parameters for the formation and dissociation of metal complexes involving ionic, molecular and/or particulate metal ligands dispersed in solution [12,15,16]. In turn, these rate constants, together with the diffusion properties of the various metal forms, determine the lability of the complexed metal species, i.e., their contribution to the dynamic supply of free metals to the biosensor surface [12,15]. Though the Biotic Ligand Model (BLM) [17–20] and related thermodynamic metal speciation computations (e.g., Visual-MINTEQ program [21]) are commonly adopted to link empirically bioluminescence and the concentration of bioavailable metal ions (a priori assimilated by BLM to the bulk concentration of free, non-complexed metals) [22–26], their failure to predict metal bioaccumulation has long been reported for a variety of organisms under both metal complexing and non-complexing medium conditions ([17,27] and references in [28]). The limits of BLMs include [17,28] the restrictive and often oversimplified equilibrium-based assessment of the necessarily dynamic processes that control the reactive transfer of metal species to the surface of metal-accumulating cells and the coupling with metal biouptake and bioaccumulation [15].

Bioluminescence signals are not only impacted by the aforementioned metal speciation-related factors but also intimately dictated by the expression level of the reporter gene set under the transcriptional control of the metal-inducible promoter, and by the kinetics of reporter protein production (i.e., luciferase) [13,29,30]. These processes are themselves mediated by the physiology of the cell sensors [13,31,32] that relates to the concentration and quality of nutrients in the medium, ‘quality’ being understood here in terms of the amount of energy provided to the sensing cell and expressed per mole of nutritive compound. These nutritional conditions are obviously critical because they contribute to the maintenance of cell viability, required metabolic function, resistance function, and renewal cell functions [3]. They further condition the performance of the biosensors by supplying the energy source (e.g., amino acids and sugars) necessary to sustain the production of bioluminescence [32–36]. This energy demand can be more or less satisfied depending on nutrient bioavailability, cell concentration and the occurrence of nutrient complexation in solution or their adsorption onto abiotic particles [37].

Though there have been many attempts to correlate metal bioavailability and bioluminescence by whole-cell metal bioreporters from equilibrium BLM-like modelling and the use of luminescence calibration curves [22–26,38], very few studies have addressed how the bioavailability and quality of nutrients impact the time–response of the biosensor. Such an analysis, however, is required to ensure the applicability of the tacitly supposed equivalence between measured sample and calibration media in terms of the energy supply to the bacteria, and thereby control that biosensor performance in the former can be properly inferred from that derived in the latter. In support of this requirement, Neelson et al. [39] showed that the synthesis and activity of luciferase are connected to the metabolic state of the bacteria—more exactly to the nature of the carbon source present in the medium and to the efficiency by which cells exploit this resource. The underlying catabolite repression of bacterial luminescence therefore has direct functional implications, and luciferase cannot be considered as a nonfunctional enzyme system. Following this pioneering work, Shimada et al. [33] showed that the real-time dynamics of metabolism in *Escherichia coli* constitutively expressing *luxCDABE* could be measured by monitoring the time-dependent expression of bacterial luciferase activity on the premise that such activity is proportional to the produced bioluminescence.

Recently, Duval and Pagnout [14,32] demonstrated that the bioluminescence generated by metal-sensing *luxCDABE E. coli* is not linearly related to the cell photoactivity that is itself defined by the overall capacity of the cell sensor to produce light (which includes luciferase activity) under given nutritive conditions. Instead, they demonstrated that the bioluminescence produced at any time  $t$  is connected to the corresponding cell photoactivity by a convolution product that involves terms pertaining to the dynamics of bioavailable metal transfer from solution to the biosensor surface and to the kinetics of photons emission after metal internalization. They further showed that an increase in the concentration of amino acids in solution (at constant total cell concentration over time) results in a transition from mono- to bi-modal bioluminescence emission due to a global regulatory mechanism called the stringent response. Applications of the theoretical formalism elaborated by Duval and Pagnout [14] then allowed to distinguish between signal contributions associated with the flux of metal biouptake and changes in cell photoactivity following variations in amino acid bioavailability over time. For a signal controlled by cell stringent response, the initial biouptake of amino acids available in solution leads to a short-term bioluminescence peak followed by a long-term emission. The latter is associated with the use of amino acids that are self-synthesized by the cells from intermediates in glycolysis (Embden–Meyerhof–Parnas pathway, or EMP), pentose phosphate pathway (PPP) and citric acid cycle (TCA cycle) in response to significant amino acid depletion from solution generated during the short-term emission. In turn, time-dependent bioluminescence signals may be viewed as spectra reflecting all cell energy demands during the bioassay and their functional metabolic pathways in the same way as, e.g., Raman spectra discriminate chemical compounds according to their vibrational properties [32]. The possibility to fine-tune bioluminescence emission patterns over time through rational modulations of nutrient bioavailability in solution is obviously very attractive, not only for a comprehensive understanding of the intricate relationships between bioluminescence signals and metal bioavailability but also from the perspective of monitoring the toxicity of exogenous elements towards bacteria featuring different energetic trade-offs over the course of time.

In view of the above elements and following our previous work [32], the main objective of the current study is to explore how coupled stringent response and catabolite repression affect the bioluminescence response of metal-detecting *E. coli* sensors containing the *luxCDABE* operon set under the control of a Cd-inducible pZntA promoter. Briefly, depending on the extent of this coupling, adjusted here by varying concentrations in amino acids (and source thereof) in glucose and xylose, it is shown that the modality and emission delay of a bioluminescence signal can be finely tuned on demand. In detail, we demonstrate that the signal takes the form of a well-defined mono, bi, tri- or even quadri-modal emission, the magnitude of each successive peak being linearly related to the total Cd

concentration in solution taken here in the 0–20 nM range where metal-induced toxicity is excluded [13,14,32]. The amplitude, time-position and shape of the observed sequential peaks are further successfully reconstructed on the basis of our recent theory [14] on kinetics of bioluminescence production by whole-cell metal *lux*-bioreporters. Ultimately, the results discussed in this work advocate for considering *time-dependent cell photoactivity* as a proxy for probing the effects of chemical stressors (e.g., lack of essential nutrients in solution) on luminescent bacterial sentinels and their metabolism in, e.g., complex environmental media. This work further evidences the benefits of measuring bioluminescence signals with min-data acquisition frequency over several tens of hours, which contrasts with current biosensing practices that are mostly restricted to the mere consideration of the only maximal signal amplitude without the mechanistic exploitation of the full cell signal dependence on time.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Luminescent Whole-Cell Bacterial Reporters

The bioluminescent cadmium-detecting cells adopted in this work were constructed from the BW25113 *Escherichia coli* strain obtained from the Coli Genetic Stock Center at Yale University [40]. Briefly, this biosensor was constructed by introducing the plasmid pUCD615 pZnt-lux [41] containing the *luxCDABE* operon under the control of the cadmium-inducible pZntA promoter.

### 2.2. Cell Growth Condition, and Media Composition Adopted for the Bioluminescence Assays

The cryo-preserved (−80 °C) bacterial cells were inoculated on LB-agar agar supplemented with 50 µg/mL of ampicillin and 30 µg/mL of kanamycin, and they were incubated at 37 °C for 24 h. Isolated colonies were transferred to a 125 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of an LB medium (10 g/L of casein peptone, 5 g/L of yeast extract and 10 g/L of NaCl, Fisher Scientific™, Hampton, NH, USA) supplemented with 20 µL of ampicillin (50 mg/mL) and 60 µL of kanamycin (10 mg/mL), and samples were then incubated at 37 °C for 9 h under agitation at 160 rpm. Pre-cultured cells were used to inoculate at a 1:100 dilution 100 mL of an LB medium with 300 µL of kanamycin (10 mg/mL) and 100 µL of ampicillin, after which cells were incubated overnight at 37 °C under agitation at 160 rpm. The OD<sub>600nm</sub> of the prepared bacterial suspensions was measured, and samples were then subdivided into 16 aliquots of 5 mL. These 16 aliquots were washed twice by centrifugation (7000× g, 3 min) with an nGGM medium (40 mM MOPS (Acros organics, Hampton, NH, USA), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 12.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Merck, Kenilworth, NJ, USA), 10 mM KNO<sub>3</sub> (Normapur®, Radnor, PA, USA), 5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Normapur®), 0.068 mM CaCl<sub>2</sub> (Prolabo, Radnor, PA, USA), and 5 mM β-glycerophosphate (Sigma, St Louis, MO, USA) at pH 6.8 adjusted by the addition of 0.1 M NaOH) supplemented with tryptone (1% v/v) as the amino acid source (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and glucose and xylose (Sigma-Aldrich) at different concentration ratios (100/0, 50/50, 30/70, 20/80, 18/82, 16/84, 14/86, 12/88, 10/90, 6/94, 4/96, 2/98, and 0/100). Below, we denote as  $x$  the ratio between glucose concentration and the sum of glucose and xylose concentrations, the explored conditions thus corresponding to  $x = 1, 0.5, 0.3, 0.2, 0.18, 0.16, 0.14, 0.12, 0.1, 0.06, 0.04, 0.02$ , and 0, respectively. Cell suspensions were resuspended in these media in order to obtain a final optical density of 2.0 at 600 nm. Two additional glucose/xylose concentration ratios (100/0 ( $x = 1$ ) and 0/100 ( $x = 0$ )) were further prepared without tryptone supplementation. A situation in which the medium lacked both glucose and xylose was also examined. In all cases, the 100% glucose and 100% xylose reference conditions corresponded to 0.5% (m/v) glucose and 0.5% (m/v) xylose concentrations in the medium, respectively. Bioluminescence assays were further conducted upon replacing 1% (v/v) tryptone by 1% and 1.5% LB.

### 2.3. Bioluminescence Measurements

Bioluminescence measurements were performed in a 96-well microplate (Nunc™, Thermo Scientific™, Paris, France) with a SAFAS Xenius luminometer (SAFAS, Monaco). Wells were filled with 70 µL of Milli-Q ultrapure water, 10 µL of nGGM medium, 10 µL of bacterial culture prepared along the lines detailed in Section 2.2, and 10 µL of Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Fluka) in order to obtain a final total concentration range of Cd(II) from 0 to 20 nM (adopted values: 0, 4, 8, 12, 16 and 20 nM). The latter corresponded to a linear response of the biosensors and to the absence of metal-induced toxicity effects [13,14,32]. In turn, the concentration of tryptone and LB adopted for the bioluminescence assays was 0.1% (*v/v*) and 0.1–0.15%, respectively, and that of the nGGM-glucose/xylose medium corresponded to a 5-fold dilution of the nGGM glucose/xylose solution prepared as detailed in Section 2.2. Luminescence was measured at 490 nm every 5 min for 48 h at 25 °C, each measurement being preceded by orbital shaking for 10 sec (3 mm amplitude at 10 Hz frequency). Control experiments were carried out at a 0 nM Cd concentration, and—unless otherwise specified (i.e., in Supplementary Figure S1)—the bioluminescence responses measured at 4, 8, 12, 16 and 20 nM Cd concentrations were systematically corrected for the 0 nM reference data by simple point-by-point subtraction. It is recalled here that the bioluminescent sensor of interest in this work responds to both Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> metals [24]. The aforementioned subtraction eliminated the low-signal contribution of trace Zn<sup>2+</sup> present in the media. An illustrative example of raw bioluminescence signals measured at 0, 4, 8, 12, 16 and 20 nM is provided in Supplementary Figure S1. We verified that the contribution of the reference signal at 0 nM Cd concentration to signals measured in the presence of Cd was insignificant under all tested medium conditions except in the long-term emission mode corresponding to xylose metabolism (i.e., in the time domain where bioluminescence in that mode decreased to 0; see Discussion). In addition, we verified that the optical density at 600 nm remained constant at a value of 0.2 for the full duration of the bioluminescence assays, which ensured that total cell concentration did not vary with time. This condition facilitated the quantitative evaluation of cell photoactivity with time and its dependence on nutritive medium conditions. The connection between cell photoactivity and bioluminescence at time *t* is briefly outlined in the next section.

## 3. Bioluminescence Response of Metal Whole-Cell Biosensors: Interpretative Framework

### 3.1. Theoretical Expression for the Bioluminescence

For medium compositions leading to a response of metal (M)-detecting whole-cell bacterial sensors featuring multiple bioluminescence peaks over time, a straightforward extension of our theory applied previously to interpret bimodal signals [14,32] leads to the following expression for the bioluminescence emitted at time *t*, denoted hereafter as  $\mathcal{Lum}(t)$

$$\mathcal{Lum}(t) = \sum_{i=1}^m \Psi_i c_{p,i}^{\max} J_{u,i} \{F(t) \otimes \bar{c}_{p,i}(t)\} \quad (1)$$

where the symbol  $\otimes$  stands for the convolution product in the time domain and *m* refers to the number of emission modes detectable over time via the corresponding *m* successive bioluminescence peaks.  $\Psi_{i=1,\dots,m}$  (in counts s<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> m<sup>5</sup>) is defined by

$$\Psi_i = S_a V_T k_{v,i} k_{f,i} \tau_q K_{Hi}^{-1} \quad (2)$$

where *S<sub>a</sub>* refers to the surface area of an individual biosensor, *k<sub>v,i</sub>* (counts s<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) is the kinetic constant for photon emission per mole of luciferase in emission mode *i*, *k<sub>f,i</sub>* (mol m<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) is the kinetic constant for luciferase production in mode *i*, *τ<sub>q</sub>* (s) is the characteristic timescale over which bioluminescence is emitted by a given luciferase–luciferin complex emitter [14,29,32], and *K<sub>Hi</sub>* (mol m<sup>-3</sup>) is the Hill constant that is related to the affinity of the promoter-controlling *lux*-reporter gene transcription for the M–P<sub>reg</sub> complex formed between M and intracellular regulatory protein P<sub>reg</sub> (P<sub>reg</sub> ≡ ZntR for the system of interest here). The number concentration of photoactive cells at time *t* in emission mode

$i$  is denoted as  $c_{p,i}(t) = N_i(t)/V_T$  ( $m^{-3}$ ) where  $V_T$  is the solution volume and  $N_i(t)$  is the corresponding number of light-emitting cells. As argued elsewhere [14,30],  $c_{p,i}(t)$  differs from the total concentration of cells that is constant here over the whole duration of the bioluminescence assays under the conditions of interest in this work. The dimensionless form of  $c_{p,i}(t)$ , hereafter denoted as  $\bar{c}_{p,i}(t)$ , is defined by  $\bar{c}_{p,i}(t) = c_{p,i}(t)/c_{p,i}^{\max}$  where  $c_{p,i}^{\max}$  ( $m^{-3}$ ) is the maximum concentration in photoactive cells the medium can sustain in light emission mode  $i$ . With this definition, only a (time-dependent) fraction of cells is photoactive and light production is viewed as an ‘on/off’ process. The quantity  $\bar{c}_{p,i}(t)$  obviously relates to the overall efficiency of the transcription-translation processes leading to light emission at time  $t$ , from the metal-mediated activation of the promoter to the very production of luciferase.  $\bar{c}_{p,i}(t)$  thus intrinsically depends on the nutritive conditions fixed by the composition of the medium [32]. In line with the arguments set forth by Delle Side et al. [30],  $\bar{c}_{p,i}(t)$  in Equation (1) can be equivalently interpreted as a dimensionless, time-dependent function—hereafter termed cell photoactivity in emission mode  $i$ —that modulates the bioluminescence yield of all cells between 0 (situation at  $t = 0$ ) and 1 (situation met at sufficiently large  $t$ ), with light emission thus proceeding according to a continuous process over time.

The (dimensionless) function  $F(t)$  involved in Equation (1) defines the bioluminescence response at  $t$  to the hypothetical pulse of cell concentration  $c_{p,i}(t) \equiv c_{p,i}^{\max}\delta(t)$ , with  $\delta(t)$  the Dirac impulsion at time  $t$  [14]. An analysis detailed elsewhere [14] showed that under conditions of practical interest  $F(t)$  can be recast in the form

$$F(t) = \left( e^{-k_r t} - \frac{k_{\text{eff}}}{k_r} e^{-k_{\text{eff}} t} \right) \left( 1 - \frac{k_{\text{eff}}}{k_r} \right)^{-1} \quad (3)$$

where  $k_r$  ( $s^{-1}$ ) is the kinetic constant associated with the reverse component of effective luciferase production reaction and  $1/k_r$  can accordingly be viewed as a timescale for the half-life of luciferase. For media in line with insignificant metal complexation, the timescale  $1/k_{\text{eff}}$  (s) is defined by [14]

$$1/k_{\text{eff}} = \bar{K}(1 + Bn^{-1})/k_e \quad (4)$$

where  $\bar{K}$  is the dimensionless stability constant of M-ZntR complexes,  $k_e$  (in  $s^{-1}$ ) is the kinetic constant for M excretion and  $Bn$  is the dimensionless Bosma number (also termed the bioavailability number). This number is defined by the ratio  $Bn = (D_M a^{-1})/(k_{\text{int}} K_H)$ , which compares the mass transfer coefficient of metal ions by diffusion (also called the diffusion conductance)—i.e.,  $D_M \times a^{-1}$ , with  $D_M$  ( $m^2 s^{-1}$ ) and  $a$  (m) being the M diffusion coefficient in solution and the cell radius, respectively—to the mass transfer coefficient associated with M internalization (or internalization conductance), i.e.,  $k_{\text{int}} \times K_H$  where  $k_{\text{int}}$  ( $s^{-1}$ ) is the kinetic constant for metal internalization and  $K_H$  (m) is the Henry coefficient for the adsorption of M on the transporter sites located at the cell membrane. For the sake of simplicity, the conductive acceleration of M diffusion in the double layer electric field at the cell/solution interface is not included in the above expression of  $Bn$  [42,43]. In the linear Henry regime of M internalization and in the absence of M depletion from bulk solution, the metal biouptake flux in mode  $i$ , denoted as  $J_{u,i}$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Equation (1), is defined by [14,15]:

$$J_{u,i} \equiv J_u = \left( 1 + Bn^{-1} \right)^{-1} k_{\text{int}} K_H c_{M,f}^* \quad (5)$$

where  $c_{M,f}^*$  is the free metal concentration in bulk solution; here, we have ignored the terms pertaining to passive metal biosorption, which is legitimate for sufficiently dilute cell suspensions [13]. In Equation (5), the ‘pristine’ internalization conductance  $k_{\text{int}} K_H$  is that when there is no limitation in the energy that is required for the active transfer of M across the membrane via dedicated protein transporters, i.e.,  $k_{\text{int}} K_H$  is independent of emission mode  $i$ .  $k_{\text{int}} K_H$  corresponds to the ratio  $J_u^*/K_M$ , where  $J_u^*$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) is the maximum biouptake flux reached at the full saturation of the internalization sites by M, and

$K_M$  (mol m<sup>-3</sup>) is the characteristic affinity of M for these sites. Pinheiro et al. [44] extended Equation (5) for cases where metal complexation by ligands L in solution is significant (see Equation (19) in [44]) and L are in excess over M. For orientational consideration, we hereafter consider the strongest ligand L that feature the highest affinity to M. Then, the result by Pinheiro et al. [44] can be rewritten in the form

$$J_{u,i} \equiv J_u = \left(1 + (pBn)^{-1}\right)^{-1} (1 + \bar{K}_s)^{-1} k_{int} K_{HC} c_M^* \tag{6}$$

where  $c_M^*$  is the total bulk concentration of metal species (i.e., the free metal forms and the complexed metal species, ML) that is related to  $c_{M,f}^*$  according to  $c_{M,f}^* = (1 + \bar{K}_s)^{-1} c_M^*$ —with  $\bar{K}_s = K_s c_L$  being the dimensionless stability constant of ML complex in solution and  $c_L$  is the bulk L concentration (mol m<sup>-3</sup>). The parameter  $p$  in Equation (6) is a dimensionless quantity that formulates the bioavailability of ML, i.e., the extent of its contribution to M biouptake flux following ML diffusion to the cell surface and interconversion kinetics between ML and M. In the limit of inert complexes, the conversion of M into ML and ML into M is very slow on the timescale of M and ML diffusions from bulk solution to the bioaccumulating surface, and  $p = 1$ . In the other dynamic limit of fully labile ML complexes, ML $\leftrightarrow$ M chemical equilibrium is maintained all along M and ML diffusions to the cell surface because rates of association/dissociation are here fast on the M/ML diffusion timescales:  $p$  is then given by  $p = (1 + \varepsilon \bar{K}_s)$  [44], where  $\varepsilon$  is the ratio between ML and M diffusion coefficients. It is emphasized that the popular Biotic Ligand Model (BLM) strictly and solely applies to metals and bioaccumulating systems for which  $p = 1$  and  $Bn^{-1} \rightarrow 0$ , and under non-depletive bulk medium conditions [14,15,17,28,43,44]. A comparison between Equations (5) and (6) indicates that the transition from a non-complexing metal situation to a metal-complexing scenario effectively comes to replace  $Bn^{-1}$  with  $Bn^{-1}/p$  while accounting for the relationship between  $c_{M,f}^*$  and  $c_M^*$ , i.e.,  $c_{M,f}^* = (1 + \bar{K}_s)^{-1} c_M^*$ . In turn, the expression of  $1/k_{eff}$  given by Equation (4) for non-metal complexing cases becomes the following after correcting for dynamic metal speciation

$$1/k_{eff} = \bar{K} \left[1 + (pBn)^{-1}\right] / k_e \tag{7}$$

By combining Equations (1) and (6), we can show that the maximum in bioluminescence produced in emission mode  $i$ , denoted as  $\mathcal{L}um_{max,i}$ , increases linearly with increasing  $c_M^*$ . The corresponding slope satisfies the expression

$$\partial \mathcal{L}um_{max,i} / \partial c_M^* = \Psi_i c_{p,i}^{max} k_{int} K_H \left(1 + (pBn)^{-1}\right)^{-1} (1 + \bar{K}_s)^{-1} \{F(t_{max,i}) \otimes \bar{c}_{p,i}(t_{max,i})\} \tag{8}$$

where  $t_{max,i}$  is defined by  $\mathcal{L}um(t = t_{max,i}) = \mathcal{L}um_{max,i}$ , with  $t_{max,i} < t_{max,i+1}$ . For situations where a threshold value of  $c_M^*$  is required for cells to emit light in emission mode  $i$ , Equation (8) remains valid upon specifying the constrain  $\bar{c}_{p,i}(t) = 0$  for  $c_M^* \leq c_{M,i}^{*,ind}$ , with  $c_{M,i}^{*,ind}$  being the minimum bulk M concentration value required for bioluminescence induction in emission mode  $i$ . Equation (8) highlights the intricate balance between physicochemical and energetic contributions to bioluminescence, the combination of which defines the overall performance of the metal whole-cell biosensor in emission mode  $i$ . For example, a medium with poor metal complexation capacity (i.e., low  $\bar{K}_s$ ) may well lead to a lower  $\partial \mathcal{L}um_{max,i} / \partial c_M^*$  compared to that measured in another medium where metal complexation is significant but nutritional quality is higher (larger  $\bar{K}_s$  and  $\bar{c}_{p,i}(t_{max,i})$ ). This is the direct consequence of the interplay between metal bioavailability in solution on one hand and nutrient bioavailability/quality on the other.

### 3.2. Methodology for Quantitative Reconstruction of Measured Time-Dependent Bioluminescence Signals

The straightforward rewriting of Equation (1) leads to the following expression of  $\mathcal{Lum}(t)$  for the illustrative case  $m = 3$

$$\frac{\mathcal{Lum}(t)}{\mathcal{Lum}_{\max,1}} = \frac{F(t) \otimes \bar{c}_{p,\text{eff}}(t)}{F(t_{\max,1}) \otimes \bar{c}_{p,1}(t_{\max,1})} \tag{9}$$

where  $F(t)$  is given by Equation (3) and  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  is the (dimensionless) cell photoactivity defined at any time  $t$  by

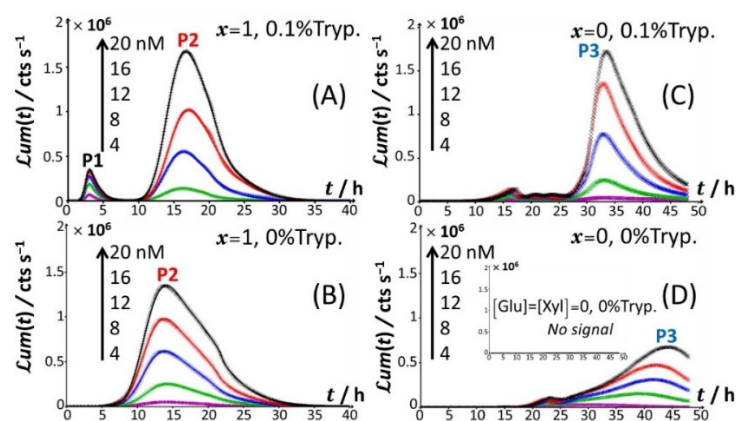
$$\bar{c}_{p,\text{eff}}(t) = \bar{c}_{p,1}(t) + \sum_{i=2}^3 \frac{\Psi_i J_{u,i} c_{p,i}^{\max}}{\Psi_1 J_{u,1} c_{p,1}^{\max}} \bar{c}_{p,i}(t) \tag{10}$$

For the sake of generality, we have conserved in Equation (10) the  $i$ -indexation for the metal biouptake flux. Given their definitions in Section 3.1,  $\bar{c}_{p,i=1,\dots,m}(t)$  verifies the condition  $\bar{c}_{p,i=1,\dots,m}(t \rightarrow \infty) \rightarrow 1$  unless otherwise specified. They should further comply with the initial boundary  $\bar{c}_{p,i=1,\dots,m}(t = 0) = 0$  to ensure the condition  $\mathcal{Lum}(t = 0) = 0$ . The modeling of the cell signal by Equations (9) and (10) offers the advantage of expressing  $\mathcal{Lum}(t)$  in a non-dimensional form and to make explicit in Equation (10) the ratios  $\frac{\Psi_{i=2,3} J_{u,i=2,3} c_{p,i=2,3}^{\max}}{\Psi_1 J_{u,1} c_{p,1}^{\max}}$  that express the gain or loss in cell photoactivity within emission modes 2 and 3 in comparison to mode 1 taken as an “internal reference”. Using Equation (9), the methodology adopted to reconstruct the measured response of the metal biosensors involves three steps: (i) for each metal concentration  $c_M^*$  tested, normalize the measured  $\mathcal{Lum}(t)$  (after their correction for the background response collected at 0 nM Cd concentration) by the corresponding  $\mathcal{Lum}_{\max,1}$ ; (ii) find the required  $\bar{c}_{p,1}(t)$ ,  $1/k_r$  and  $1/k_{\text{eff}}$  to reproduce the time-dependence of  $\mathcal{Lum}(t)$  measured in emission mode 1; (iii) find the required  $\bar{c}_{p,i=2,3}(t)$  and the dimensionless scalars  $\frac{\Psi_{i=2,3} J_{u,i=2,3} c_{p,i=2,3}^{\max}}{\Psi_1 J_{u,1} c_{p,1}^{\max}}$  that recover the biosensor response measured over the time windows corresponding to the emission modes 2 and 3 with the constants  $1/k_r$  and  $1/k_{\text{eff}}$  determined in step (ii) and used as fixed parameters for each considered  $c_M^*$  condition. In turn, the completion of steps (i)–(iii) leads to the evaluation of  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  via Equation (10). Similarly to our procedure adopted in [32], the searched functions  $\bar{c}_{p,i}(t)$  in steps (ii)–(iii) correspond to Gompertz law commonly adopted for modelling cell growth curves or to increasing sigmoidal function of time that involves the error (erf) function (case of emission mode 1). For cases where the truncation of bioluminescence peak(s) is detected (see details in Section 4.1), the corresponding abrupt decay of bioluminescence with time is recovered upon correcting  $\bar{c}_{p,i}(t)$  with help of a decreasing exponential function of time. Data fitting to Equations (9) and (10) was systematically performed on the basis of the Levenberg–Marquardt procedure, and the PTC Mathcad Prime code developed for that purpose is available on request. For a given measured bioluminescence signal, we systematically verified that the relative error in the estimates of  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  (at fixed time  $t$ ),  $1/k_r$  and  $1/k_{\text{eff}}$  did not exceed 10%.

## 4. Results and Discussion

### 4.1. Impacts of Nutritive Conditions on the Modality of the Bioluminescence Signal

Figure 1 reports the time-dependent bioluminescence response of Cd-responsive biosensors as a function of total Cd concentration in solution in the presence and absence of amino acids (Figure 1A–D) for the nutritive conditions  $x = 1$  (glucose-containing solution without xylose; Figure 1A,B) and  $x = 0$  (xylose-containing solution without glucose; Figure 1C,D).

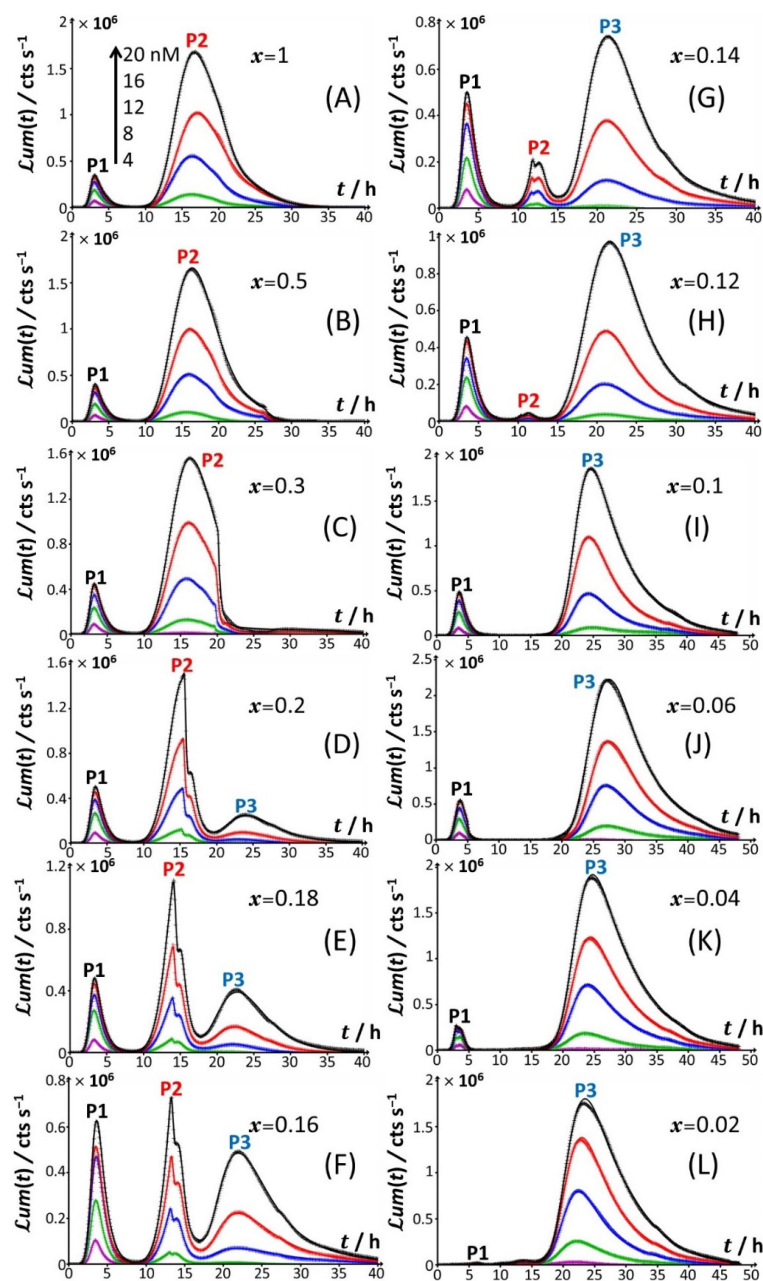


**Figure 1.** Time-dependent bioluminescence ( $Lum(t)$  in counts per second) produced by Cd-responsive whole-cell biosensors in the presence of glucose and the absence of xylose ( $x = 1$ ) and vice versa ( $x = 0$ ), with or without the supplementation of 0.1% tryptone (abbreviated as Tryp.), as specified in panels (A–D). Measurements are reported for different total Cd concentrations in the range of 0–20 nM (indicated).  $t = 0$  corresponds to the introduction of Cd in solution and the start of bioluminescence measurement. Signals were corrected by point-by-point subtraction of the corresponding cell response measured in 0 nM Cd concentration.

Under all examined medium conditions, the cell response took the form of bell-shaped signal(s) with a marked dependence on Cd concentration, which validates the genetic construction of a Cd-sensing *E. coli* strain. In the presence of both amino acids and glucose (Figure 1A), the bioluminescence emission is bimodal, with the appearance of a short-term peak (P1) at  $t_{max,1} \sim 3$  h and a long-term peak (P2) at  $t_{max,2} \sim 16$  h, where  $t_{max,1}$  and  $t_{max,2}$  correspond to the time positions where maxima in P1 and P2 are achieved, respectively. This bimodality is qualitatively in line with the bioluminescence data reported by Duval and Pagnout [32] for another Cd-sensing luxCDABE *E. coli* strain (JW3596) measured in a diluted nGGM medium (source of glucose) supplemented with LB as the source of amino acids (instead of tryptone in Figure 1A). Briefly, the appearance of the two successive peaks originates from the stringent cell response. The first luminescence emission (peak P1) is controlled by the absorption of amino acids bioavailable in the medium and brought by tryptone. When there is a shortage of amino acids in solution, the level of uncharged tRNA critically increases, which results in the production of alarmones (p)ppGpp. These alarmones reprogram the resource-consuming processes by decreasing the levels of transcriptional machinery of tRNA and ribosome synthesis and by activating the transcription of genes for the biosynthesis of amino acids. In turn, cells recover their capacity to produce bioluminescence once they have self-palliated the deficiency of amino acids in solution, which is reflected by the appearance of the peak P2 [32,45]. In agreement with this stringent-response mechanism, the suppression of the amino acid source from the medium at  $t = 0$  leads to the only peak P2 and the absence of peak P1 (Figure 1B). Under conditions where the medium contain amino acids but glucose is replaced by xylose (Figure 1C), cell response develops into a distinctive peak (hereafter denoted as P3) appearing at  $t_{max,2} \sim 33$ –35 h, and this peak is preceded by wavy modulations of the bioluminescence in the time range of 15–25 h. Given the times at which P1 and P2 peaks are observed in Figure 1A,B and the one marking the appearance of P3 in Figure 1C, the shift from the glucose-to-xylose carbon source obviously and significantly delays the cell response and modify the cell energetic trade-off, leading to the aforementioned stringence-controlled production of luminescence. Remarkably, starting from the situation in Figure 1C where xylose is the only carbon source, the suppression of amino acids in solution (Figure 1D) leads to vanishing of the pre-cited wavy modulations in bioluminescence and to a better-defined signal located at the foot of peak P3 that then spreads over a larger time window ( $t_{max,3} \sim 30$ –45 h depending on Cd concentration). Finally, the lack of both amino acid and sugar carbon sources in the medium (inset Figure 1D) result in the absence of any bioluminescence production, as



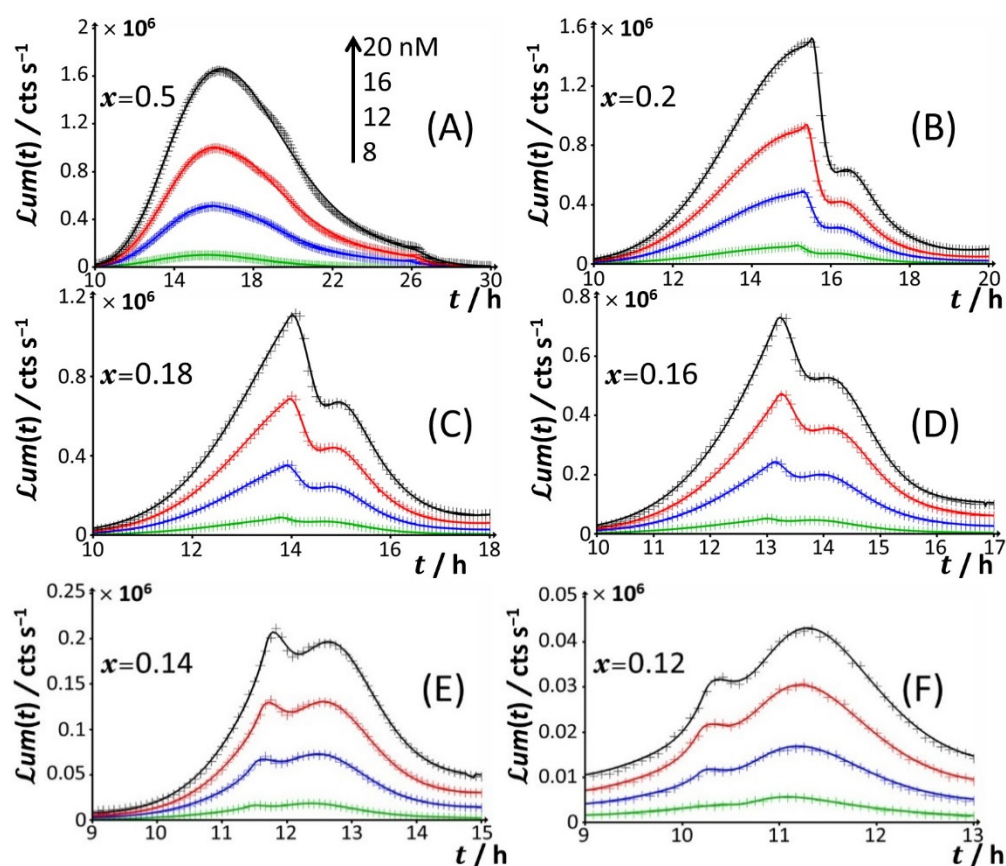
expected from the recognized key importance of sugars as source of energy for bacteria. In order to refine our analysis of the way bioluminescence response is mediated by nutrient bioavailability (i.e., presence/absence of amino acids and presence/absence and nature of sugar components), the cell response patterns featured in Figure 1 for the extremes  $x = 0$  and  $x = 1$  are detailed in Figure 2 for conditions that cover a large range of  $x$ -values between 0.02 and unity in a medium containing 0.1% tryptone.



**Figure 2.** Time-dependence of bioluminescence ( $Lum(t)$ ) measured for the Cd-responsive *E. coli* biosensor as a function of total Cd concentration in the range of 0–20 nM (indicated) in nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and different concentrations of glucose and xylose, as subsumed in  $x$  with  $0.02 \leq x \leq 1$ . The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B–L). (+) symbols: experimental data. Lines: reconstruction on the basis of the theory outlined in Section 3. Signals were corrected by point-by-point subtraction of the corresponding cell response measured in the 0 nM Cd concentration. The quality of theoretical reconstructions of the bioluminescence signals normalized following Equation (9) is reflected by the root mean square values reported in Supplementary Table S1.

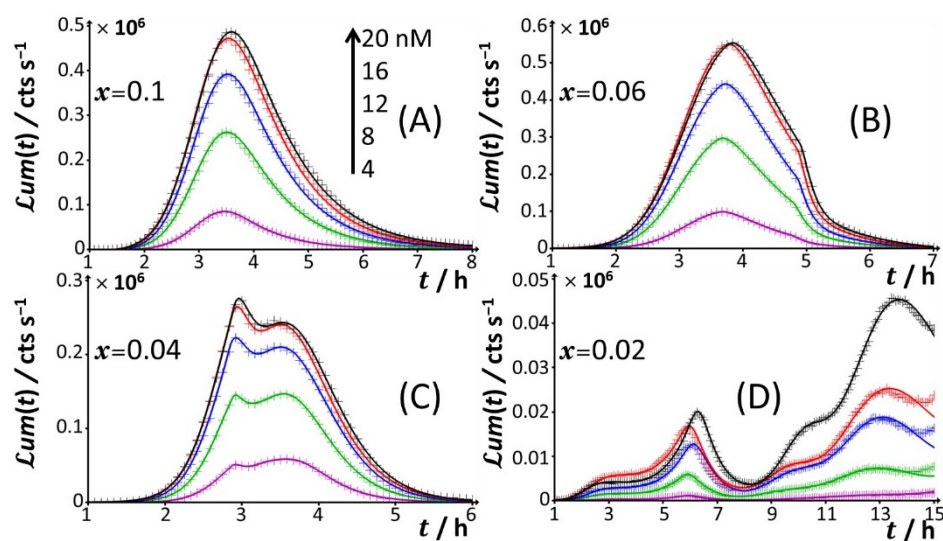
Starting from Figure 2A, which corresponds to the nutrient conditions examined in Figure 1A ( $x = 1$ ) and to a bimodal bioluminescence emission controlled by a stringent cell response (peaks P1 and P2 at  $t_{\max,1} \sim 3$  h and  $t_{\max,2} \sim 16$  h, respectively), a decrease in glucose concentration from  $x = 1$  to 0.5 and 0.3 (Figure 2B,C) results in a truncated peak P2. The truncation appears at a timepoint hereafter denoted as  $t_2^*$ , with  $t_2^* \sim 26$  h and 20 h for  $x = 0.5$  and 0.3, respectively. This truncation materializes in an abrupt drop of the bioluminescence with time for  $t > t_2^*$  and a resulting discontinuity of the derivative of the signal with respect to time at  $t = t_2^*$ . In addition, the shape and time-position of peak P1 remain basically unchanged, as is the time position of peak P2 compared to the case  $x = 1$ . With decreasing  $x$  from 0.3 to 0.2 (Figure 2D), the truncation of peak P2 is shifted to a shorter timepoint ( $t_2^* \sim 15$  h), in agreement with the trend commented for  $t_2^*$  when decreasing  $x$  from 0.5 to 0.3. As a result, the time-position of the maximum of peak P2 slightly decreases to  $t_{\max,2} \sim t_2^* \sim 15$  h. The new features in Figure 2D are the appearance of a right shoulder in (the descending part of) the P2 signal (i.e., for  $t_2^* < t \leq \sim 20$  h) and the emergence of a third signal (peak P3) that spans over the time range of  $\sim 20$  h  $\leq t \leq \sim 40$  h and reaches a maximum at  $t_{\max,3} \sim 24$  h. The amplitude of peak P3 further increases with Cd concentration in solution. A progressive decrease in  $x$  from 0.2 to 0.12 (Figure 2D–H) leads to an increase in the magnitude of peak P3 at a fixed Cd concentration and to a concomitant gradual extinction of peak P2 (Figure 3). This extinction is accompanied by a truncation of the peak P2 that then appears earlier with time (decreasing  $t_2^*$ ), consistent with the trend described above for  $t_2^*$  and  $0.5 \leq x \leq 0.2$  (Figure 3). The associated discontinuity of the P2 signal, very well-observed at  $x = 0.3$  (Figure 2C) and  $x = 0.2$  (Figures 2D and 3B), leaves place at lower values of  $x$  to a P2 signal that looks more like a doublet (Figure 3D–F). This transition stems from the fact that the shoulder in peak 2 (as clearly observed at, e.g.,  $x = 0.2$ ) has gradually ‘cropped’ the whole P2 signal upon decreasing  $x$ . In turn, this leads to a ratio between the two sequential (short-term and long-term) extrema identifiable within peak P2 that ranges from values larger than unity for  $0.3 \leq x \leq 0.16$  (Figure 3B–D), to  $\sim 1$  for  $x = 0.14$  (Figure 3E), and to values lower than unity for  $x = 0.12$  (Figure 3F). Due to this increased contribution of the shoulder, positioned at the right side of the peak P2 at  $x = 0.2$ , the delay of the appearance of peak P2 ( $t_{\max,2}$ ) is shifted to shorter times when switching the carbon source from glucose to xylose in the range of  $1 \leq x \leq 0.12$  (Figures 2 and 3), decreasing from  $t_{\max,2} \sim 16$  h at  $x = 1$  to  $t_{\max,2} \sim 11.5$  h at  $x = 0.12$ .

For glucose concentrations corresponding to  $x < 0.12$  (Figure 2I–L), peak P2 disappears and the signal takes the form of a P1–P3 bimodal emission. Remarkably, at sufficiently low  $x$  in line with such a P1–P3 signal (i.e.,  $x = 0.06$ ), peak P1 is distinctly truncated (Figures 2J and 4B) in a way similar to that previously detailed for peak P2 at  $x = 0.5$  and  $x = 0.3$ . At lower values of  $x$  (i.e.,  $x = 0.04$ ; Figure 4C), the truncated peak P1 splits into two sub-peaks whose respective amplitudes clearly increase with Cd concentration before leveling off for 16–20 nM Cd in solution. The shape of the resulting doublet qualitatively conforms to that of peak P2 observed at  $x = 0.14$  (Figure 3E). At  $x = 0.02$  (Figures 2L and 4D), the defining properties of the P1 doublet are no longer recognizable in the bioluminescence emission pattern. Indeed, the magnitude of P1 peak has here largely decreased, and the overall cell response is then dominated by the peak P3 preceded by the wavy modulations in bioluminescence shown in Figure 1D for glucose-lacking medium.



**Figure 3.** Time-dependence of bioluminescence ( $Lum(t)$ ) measured for the Cd-responsive *E. coli* biosensor as a function of total Cd concentration in the range of 0–20 nM (indicated) in nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and different concentrations of glucose and xylose (subsumed in the variable  $x$ ). Data are given for selected values of  $x$ , and they refer to the only peak P2 identified in Figures 1 and 2. The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B–F). (+) symbols: experimental data. Lines: reconstruction on the basis of the theory outlined in Section 3. Signals were corrected by point-by-point subtraction of the corresponding cell response measured in 0 nM Cd concentration. See text for details.

Remarkably, when replacing the amino acid source (0.1% tryptone) with 0.15% LB, the basic features of the cell response shown in Figure 2 when changing glucose concentration remain qualitatively similar (Supplementary Figure S2). Specifically, the biosensor signal changes from a bimodal P1–P2 signal to a P1-truncated P2 signal with gradually decreasing  $x$ , followed by a trimodal P1–P2–P3 emission, a bimodal P1–P3 response, and (finally) a bioluminescence response dominated by the only peak P3 at sufficiently low values of  $x$ . The presence of a shoulder in the severely truncated peak P2, as illustrated in Figure 2, is also shown in Figure S2 (e.g., in panel D) despite the lower frequency of bioluminescence data acquisition adopted for measurements in LB (one measurement every 15 min instead of every 5 min; see Figure 2), which makes the observation of signal truncation more difficult. Last, for a selected range of  $x$  conditions, we verified that changing LB concentration (Figure S3, 0.1% LB) qualitatively leads to the preservation of the different bioluminescence patterns measured in 0.15% LB. The observed differences are only relative to the respective magnitudes of the detected peaks P1, P2, and P3. This latter result echoes our previous finding on stringence-controlled cell response and the related LB concentration-dependent ratio between the maxima of peaks P1 and P2 [32].



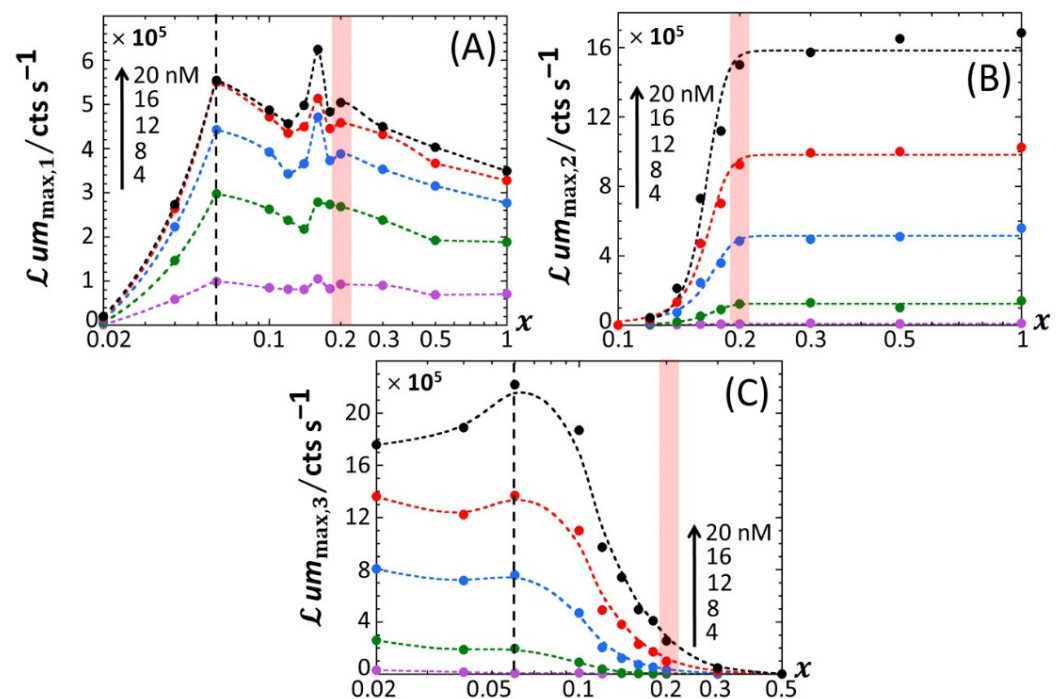
**Figure 4.** Time-dependence of bioluminescence ( $Lum(t)$ ) measured for the Cd-responsive *E. coli* biosensor as a function of total Cd concentration in the range of 0–20 nM (indicated) in nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and different concentrations of glucose and xylose (subsumed in the variable  $x$ ). Data are given for selected values of  $x$ , and they refer to the only peak P1 identified in Figures 1 and 2. The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B–D). (+) symbols: experimental data. Lines: reconstruction on the basis of the theory outlined in Section 3. Signals were corrected by point-by-point subtraction of the corresponding cell response measured in 0 nM Cd concentration. See text for details.

Prior to detailed discussion of the mechanisms underlying the remarkable bioluminescence time-profiles with changing concentrations in amino acids and sugars (Section 4.3), we quantitatively analyze the way the maxima of peaks P1, P2 and P3 depend on nutritive conditions and Cd concentration in solution.

#### 4.2. Impacts of Nutritive Conditions on Bioluminescence Maxima

Figure 5 reports the dependence of the maxima of the peaks P1, P2 and P3—denoted as  $Lum_{\max,1}$ ,  $Lum_{\max,2}$  and  $Lum_{\max,3}$ , respectively—on the dimensionless glucose to total sugar concentration ratio,  $x$  and on the total Cd concentration,  $c_{Cd}^*$ , under the conditions detailed in Figures 2–4 (0.1% tryptone). The critical value of  $x$  where peak P3 appears in the biosensor response, denoted hereafter as  $x^*$  with  $x^* \sim 0.2$ , is explicitly indicated by the red-colored transition zone in Figure 5. In the range of  $x$ -values satisfying  $x > x^*$ , the biosensor response displays a P1–P2 bimodality over time with  $Lum_{\max,1}$  that somewhat increases with decreasing  $x$  from 1 to  $x^*$  for  $c_{Cd}^* \geq 8$  nM (Figure 5A). In addition, at fixed  $x$   $Lum_{\max,1}$  clearly levels off for  $c_{Cd}^* \geq 16$  nM. In contrast, under such conditions,  $Lum_{\max,2}$  remains independent of  $x$  and increases with  $c_{Cd}^*$  in the whole range of examined metal concentration (Figure 5B). With decreasing glucose concentration from  $x = x^*$  to 0.02,  $Lum_{\max,2}$  monotonously decreases to 0 regardless of Cd content in solution. This suppression of peak P2 is combined with the appearance of peak P3, whose magnitude  $Lum_{\max,3}$  increases with decreasing  $x$  from  $x = x^*$  to 0.02 while passing through a maximum (at  $x \sim 0.06$ ) that is most pronounced at large  $c_{Cd}^*$  (Figure 5C). This transition from a P1–P2 to P1–P3 bimodal emission is further clearly marked by a local maximum in  $Lum_{\max,1}$  at  $x = 0.16$  (Figure 5A), which is followed by a further increase in  $Lum_{\max,1}$  with decreasing  $x$  from 0.16 to 0.06 and by a massive decrease in  $Lum_{\max,1}$  with decreasing  $x$  from 0.06 to 0.02. Remarkably, the position  $x \sim 0.06$  of the maximum in  $Lum_{\max,3}$  corresponds to the onset of the significant decrease in  $Lum_{\max,1}$  with decreasing  $x$  (see vertical dotted lines in Figure 5A,C). Figure 6A–C highlights how the increase in  $Lum_{\max,1}$ ,  $Lum_{\max,2}$  and  $Lum_{\max,3}$  with increasing  $c_{Cd}^*$ , respectively, is impacted by switching the carbon source from glucose to xylose. Starting with Figure 6B (Figure 6C),  $Lum_{\max,2}$  ( $Lum_{\max,3}$ , respectively)

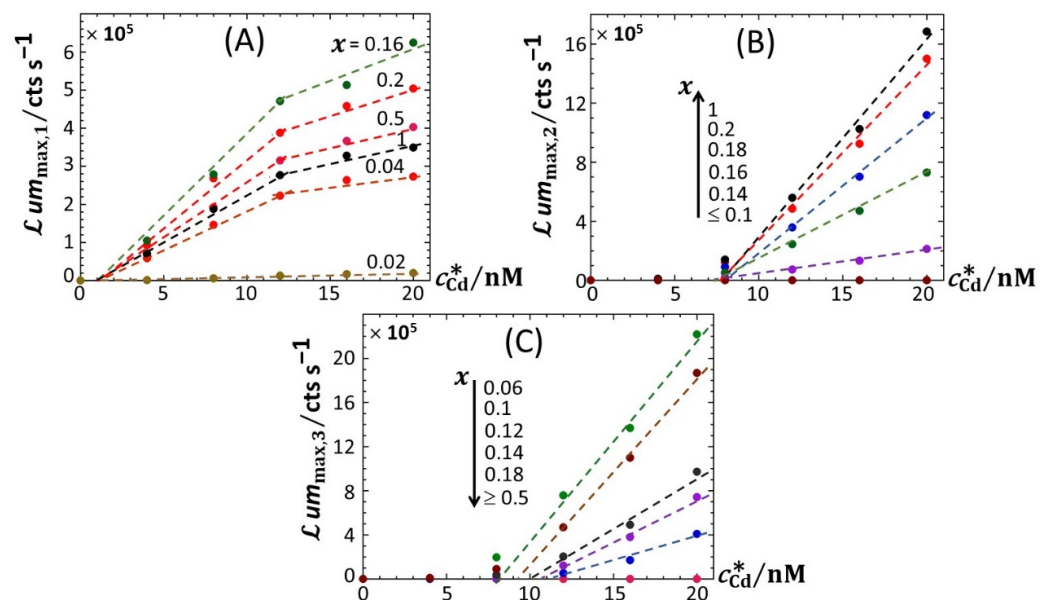
increases linearly with  $c_{Cd}^*$ , and the more so as  $x$  increases (decreases, respectively), in agreement with the qualitative inspections of Figure 5B,C. The data further indicate that the threshold value of Cd concentration above which bioluminescence is produced in the emission mode corresponding to peak P2 (ca. 8 nM) remains independent of  $x$  but decreases for peak P3 from ~11 to ~8 nM with decreasing  $x$  from 0.18 to 0.06. More remarkable are the data pertaining to peak P1 (Figure 6A). Indeed, putting aside the  $x$ -conditions corresponding to a significant extinction of peak P1 (i.e.,  $x < 0.04$ ; see Figure 5A), for this emission mode, we note that the rate of linear increase in  $\mathcal{L}um_{max,1}$  with increasing  $c_{Cd}^*$  is clearly a function of  $x$  for  $c_{Cd}^* < 12$  nM, whereas this dependence is less marked at larger Cd concentrations. In turn, this feature marks a change in the slope of the plot  $\mathcal{L}um_{max,1}$  versus  $c_{Cd}^*$  at  $c_{Cd}^* = 12$  nM.



**Figure 5.** Variations of the maxima of the bioluminescence peaks P1 (A), P2 (B) and P3 (C) with  $x$  and total Cd concentration in solution (indicated). The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B,C). (+) symbols: experimental data. Lines: guides for the eyes. The red-colored zone indicates the transition from P1–P2 to P1–P2–P3 signals. The vertical dotted lines correspond to the common positioning of the local maxima in  $\mathcal{L}um_{max,3}$  and the onset of the abrupt decrease in P1 amplitude with decreasing  $x$ . Measurement conditions: nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and different concentration ratios of glucose and xylose (subsumed in the variable  $x$ ). Data in this figure originate from those given in Figure 2 (corrected for the reference at 0 nM Cd concentration).

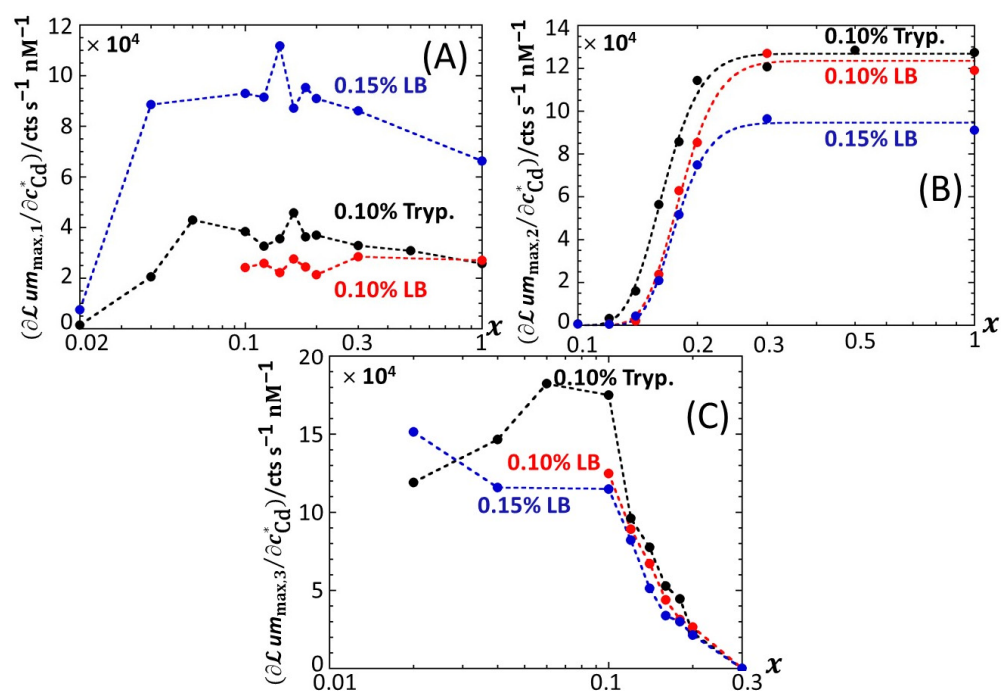
For the sake of comparison, we report in Figures S4 and S5 the equivalent of Figure 5 for 0.1% and 0.15% LB media, respectively, containing glucose-to-xylose concentration ratios in the range of  $0.1 \leq x \leq 1$  and  $0.02 \leq x \leq 1$ , respectively. In agreement with Figures 2, S2 and S3, the findings revealed by Figure 5 for  $\mathcal{L}um_{max,1}$ ,  $\mathcal{L}um_{max,2}$  and  $\mathcal{L}um_{max,3}$  in 0.1% tryptone medium also apply in 0.1% and 0.15% LB media. In particular, the presence of local maxima in the variation of  $\mathcal{L}um_{max,1}$  with  $x$  is confirmed (Figures 5A, S4A and S5A) in the range of  $0.1 < x < 0.2$ , especially at large  $c_{Cd}^*$ . Noticeably, the decrease in  $\mathcal{L}um_{max,3}$  measured at  $c_{Cd}^* = 20$  nM when decreasing  $x$  from 0.06 to 0.02 in 0.1% tryptone (Figure 5C) is no longer observed in 0.15% LB (Figure S5C). Unlike in 0.1% tryptone and 0.15% LB media,  $\mathcal{L}um_{max,1}$  remains further constant with decreasing  $x$  from 1 to 0.3 in 0.1% LB over the whole range of adopted  $c_{Cd}^*$  values (Figure S4A). As the analogue of Figure 6

pertaining to data in 0.1% tryptone medium, Figure S6 evidences linear dependences of  $\mathcal{L}um_{\max,1}$ ,  $\mathcal{L}um_{\max,2}$  and  $\mathcal{L}um_{\max,3}$  on  $c_{Cd}^*$  in 0.1% LB with varying  $x$  values (the same holds for the 0.15% LB medium; data not shown). The minimum Cd concentrations for the induction of bioluminescence in the P1 and P2 emission modes (3 and 6–7 nM, respectively) are comparable to those estimated in 0.1% tryptone, whereas the minimal Cd concentration for light induction in the P3 emission mode is independent of  $x$  in 0.1% LB (ca. 11 nM instead of 8 nM–11 nM for 0.1% tryptone depending on  $x$ ). Interestingly, the presence of the two Cd concentration regimes identified in Figure 6A from the change in the rate of increase in  $\mathcal{L}um_{\max,1}$  with varying  $c_{Cd}^*$  in 0.1% tryptone is also observed in 0.1% LB (Figure S6A), though the corresponding transition (positioned at  $c_{Cd}^* = 12$ –15 nM, depending on  $x$ ) in 0.1% LB is lesser marked. In addition, the dependence of  $\mathcal{L}um_{\max,1}$  on  $c_{Cd}^*$  in 0.1% LB is impacted by  $x$  to a smaller extent than in 0.1% tryptone. Figure 7 provides an overview of these comparative observations by reporting the slopes of  $\mathcal{L}um_{\max,1}$  (Figure 7A),  $\mathcal{L}um_{\max,2}$  (Figure 7B) and  $\mathcal{L}um_{\max,3}$  (Figure 7C) versus  $c_{Cd}^*$  for the various  $x$ -conditions tested in 0.1% tryptone, 0.1% LB and 0.15% LB. The main conclusions drawn from Figure 7 can be summarized as follows. First, the dependence of the slopes on  $x$  as estimated for the P1, P2 and P3 emission modes qualitatively follows the variation of the corresponding peak maxima with changing  $x$  (Figures 5, S4 and S5). Quantitatively, the slopes pertaining to emission P1 at a fixed value of  $x$  conform to the sequence of 0.1% LB ~ 0.1% tryptone < 0.15% LB, with the notation ‘Y < Z’ meaning ‘the slope estimated in medium Y is lower than that in medium Z under given  $x$  condition’; in the P2 emission mode, the slopes satisfy the sequence of 0.15% LB  $\leq$  0.1% LB  $\leq$  0.1% tryptone, and this sequence basically applies in the P3 emission. The respective magnitudes of the slopes relevant in P1 and P2 emissions in 0.1% and 0.15% LB media agree with the conclusions drawn from our previous work [32] on the stringence-controlled bimodal cell response and variations thereof with changing LB concentration. Finally, Figure 7B clearly highlights that the full suppression of peak P2 with decreasing glucose concentration occurs at a lower value of  $x$  in 0.1% tryptone compared to that observed in 0.1–0.15% LB situations.



**Figure 6.** Linear dependence of the maxima of the bioluminescence peaks P1 (A), P2 (B) and P3 (C) on total Cd concentration in solution (indicated) at selected values of  $x$  (indicated). (+) symbols: experimental data. Lines: linear regressions. Measurement conditions: nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and different concentrations of glucose and xylose (subsumed in the variable  $x$ ). Data in this figure originate from those given in Figure 2 (corrected for the corresponding reference measured at 0 nM Cd concentration).

Based on Equation (8), the sequence identified above for the slopes  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,1} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  in emission mode 1 (Figure 7A) where the biouptake of amino acids determines light production, can be understood as follows. Whereas Cd speciation is expected to be more significant in 0.15% LB than in 0.1% LB, the rate of increase in  $\mathcal{Lum}_{\max,1}$  with  $c_{\text{Cd}}^*$  is larger in the former medium. Accordingly, we suggest from Equation (8) that it is the increase in the carrying capacity  $c_{p,1}^{\max}$  from 0.1% to 0.15% LB that dominates the corresponding change in  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,1} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  rather than the expected increase in  $\bar{K}_s$ . The latter should, if solely considered, have led to a decrease in the slope  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,1} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  from 0.1% to 0.15% LB (see Equation (8)). The higher is the concentration in amino acids and the lesser the rate of light production becomes limited by this resource (i.e., the carrying capacity is higher), thus leading to an increase in  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,1} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  even though metal ions are expected to be lesser bioavailable in 0.15% LB. The relative magnitudes of  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,1} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  in 0.1% LB and 0.1% tryptone are quite comparable, especially at high values of  $x$ . Here, the loss in bioluminescence expected from the lower bioavailability of Cd ions in 0.1% LB due to a larger complexation (higher  $\bar{K}_s$  in Equation (8)) than in 0.1% tryptone is counterbalanced by the higher quality of the provided food in the LB medium compared to that in tryptone (i.e., higher  $c_{p,1}^{\max}$ ) due to the presence of a yeast extract that contains various amino acids, vitamins and minerals [46]. In turn, in qualitative agreement with Equation (8), both food quality and metal bioavailability features have to be advanced to understand the rather similar performance of the biosensors in 0.1% LB and 0.1% tryptone. Considering the stringence-controlled emission of light in mode 2, the sequence of slopes  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,2} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  is expected to be the invert of that discussed in mode 1. In line with [32], this expectation is verified (Figure 7B), at least for sufficiently large values of  $x$  ( $>0.2-0.3$ ) for which there is no limitation in glucose for cells to produce light. For lower values of  $x$  where glucose-limitation clearly sets in with resulting decrease in  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,2} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  along with decreasing  $x$ , differences between slopes measured in 0.1% tryptone, 0.1% LB and 0.15% LB become less pronounced as cells gradually shift the required sugar source for amino acid metabolism from glucose (P2 peak) to xylose (P3 peak). This in turn explains the opposite evolutions of  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,2} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  and  $\partial \mathcal{Lum}_{\max,3} / \partial c_{\text{Cd}}^*$  with decreasing  $x$  (Figure 7B,C), while the slope sequence versus the 0.1% tryptone, 0.1% LB, and 0.15% LB conditions in emission mode 2 is roughly the same as that in mode 3.

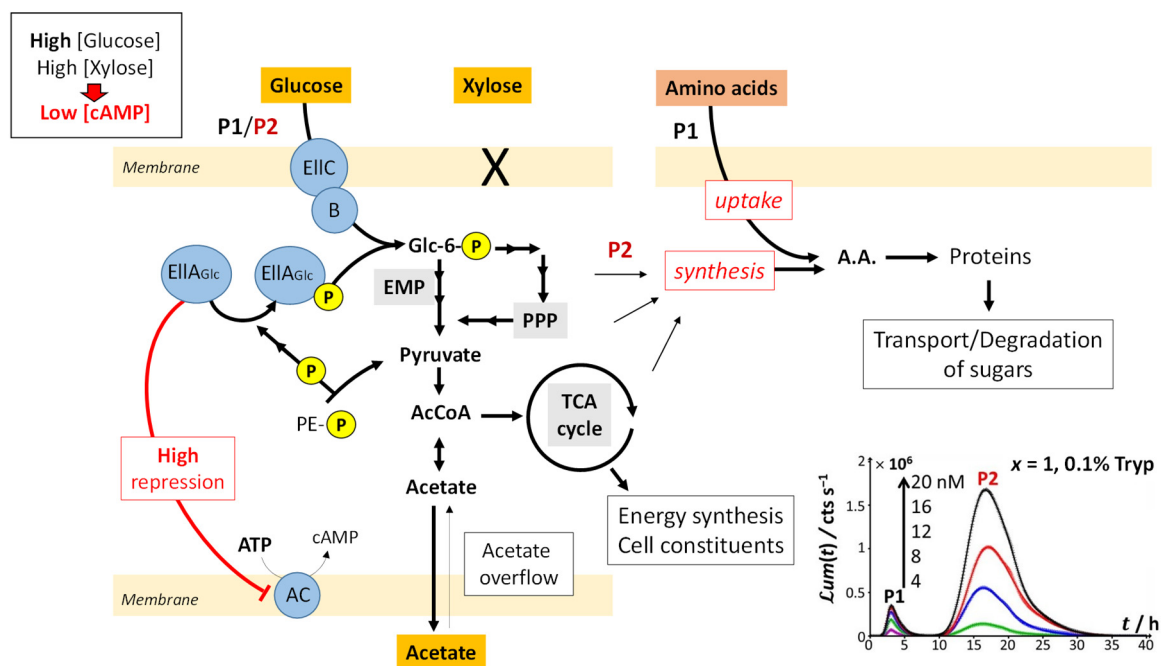


**Figure 7.** Slopes associated with the linear regressions of  $\mathcal{L}um_{\max,1}$  (A),  $\mathcal{L}um_{\max,2}$  (B) and  $\mathcal{L}um_{\max,3}$  (C) versus  $c_{Cd}^*$  for the various  $x$ -conditions tested in 0.1% tryptone, 0.1% LB and 0.15% LB media (specified). (+) symbols: experimental data. Lines: guides for the eyes. Data in this figure originate from those given in Figures 2, S2 and S3 (corrected for the corresponding reference measured at 0 nM Cd concentration).

#### 4.3. Origin of the Observed Modulations of the Bioluminescence Signal with Time and Metal Concentration: Interplay between Stringent Response and Catabolite Repression

Figures 1–4 discussed in Section 4.1 evidence marked modulations of the time-dependent bioluminescence response with varying medium composition under a given Cd concentration condition. These changes of the biosensor signal are intimately connected to the metabolic pathway at stake over time, depending on the bioavailability and nature of the resources in solution. In the presence of amino acids (either tryptone or LB) and a significant source of carbon brought by glucose (Figures 1A, S2A and S3A), peak P1 in the bimodal P1–P2 signal follows the uptake of amino acids. Their ensuing depletion from solution triggers a stringent cell response that leads to peak P2, as detailed elsewhere [32]. In detail, Figure 8 illustrates the processes that drive glucose transport and metabolism in *E. coli* together with the amino acid biosynthetic pathway. The uptake of glucose is mediated by joint action of EIIC-B proteinaceous complex (which ensures glucose transfer across the membrane) and phosphorylated EIIA proteins (that acquire their P group from phosphoenolpyruvate, denoted as PE-P in Figure 8). EIIA-P proteins transfer a phosphate group to glucose that—after the Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway (glycolysis) or the pentose phosphate pathway (PPP)—enters the Krebs cycle (or TCA cycle), which produces the energy necessary for cells to emit light. Thus, the unphosphorylated EIIA proteins (having transferred their phosphate group) repress the adenylate cyclase (AC) and therefore inhibit the production of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP), a mediator of the catabolite repression [47]. In the *E. coli* glucose metabolic pathway, several precursors for amino acid biosynthesis are primarily generated and a large part of carbon incorporated as glucose is catabolized and excreted as acetate into the medium according to a phenomenon known as acetate overflow [48].

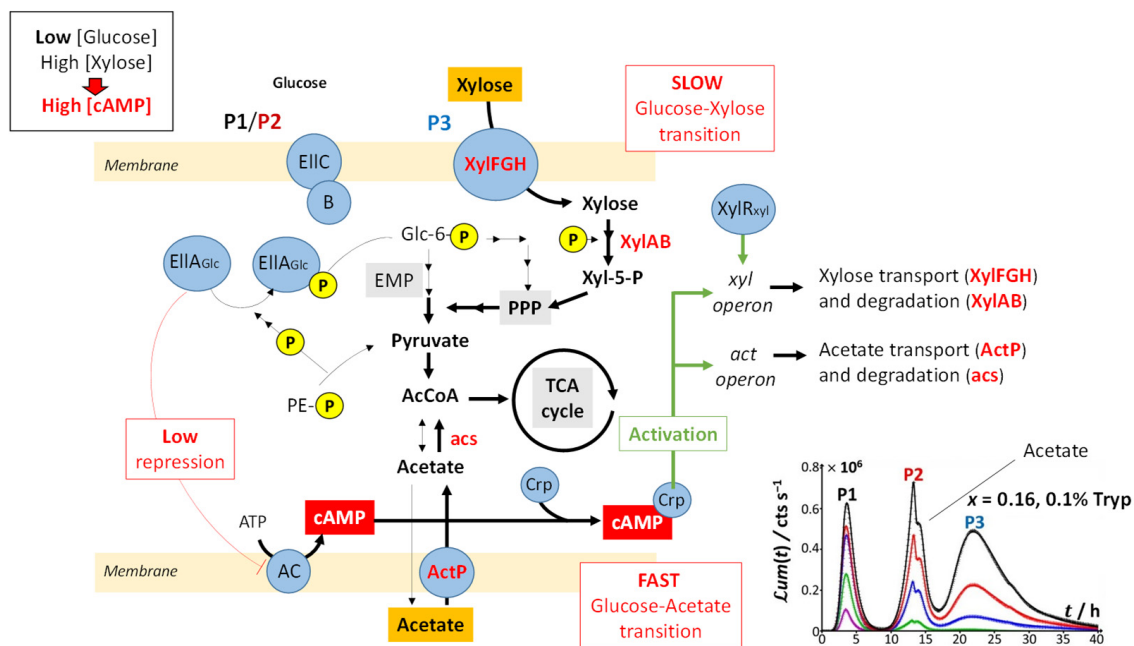




**Figure 8.** Schematic representation of the mechanisms underlying sugar degradation and amino acids uptake/synthesis in *E. coli* at sufficiently large glucose concentrations (high  $x$ ), which leads to peaks P1 and P2. Under such  $x$ -conditions, glucose is transported into the cell by the joint action of the EiIC-B and EiIA-P proteins, the main components of the sugar phosphotransferase system together with Hpr and Ei (not shown in the figure for simplicity). The EiIA-P proteins transfer a phosphate group (acquired from phosphoenolpyruvate) to glucose, which enters the TCA cycle as acetyl-CoA after degradation in the Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) or pentose phosphate pathway (PPP). This leads to the production of the energy required to sustain light production in the emission modes 1 and 2 (P1 and P2 signals, respectively). Acetate from glucose breakdown is then expelled from the cell. As a result, unphosphorylated EiIA becomes more abundant, inhibits adenylate cyclase, and lowers cAMP levels, which does not allow for both the formation of the cAMP/Crp complex and the transcriptional activation of acetate and xylose operons. Light emission corresponding to the P1 peak is thus partly determined by the concentration of bioavailable amino acids. When there is a lack of amino acids, cells reallocate resources for the synthesis of amino acids, leading to the P2 peak. Abbreviations: PE-P, phosphoenolpyruvate; Glc-6P, Glucose 6-phosphate; PPP, the pentose phosphate pathway; AcCoA, acetyl CoA; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle; AC, adenylate cyclase; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; A.A., amino acids.

Upon gradually replacing glucose by xylose (decreasing values of  $x$ ), three main signal features are observed: truncation of peak P2, followed over time by the appearance of a shoulder on peak P2 and the detection of a third bioluminescence production mode (peak P3). Whereas P2 truncation originates from glucose depletion in solution (the more so as glucose concentration decreases; see Figure 2B,C), the shoulder on peak P2 and the appearance of peak P3 are the results of catabolite repression. In detail, Figure 9 illustrates the mechanisms underlying the catabolite glucose/acetate and glucose/xylose repressions at the origin of the shoulder on peak P2 and the appearance of peak P3, respectively. For cases where glucose deficiency is sensed by the cells and xylose is present in the medium, EiIA proteins then become mainly present in the phosphorylated form and AC repression is turned off. Thus, cAMP and Crp levels increase, which activates *act* and *xyl* operons via the formation of the cAMP/Crp complex. Consequently, both acetate (previously expelled by the cell) and xylose enter the cell via ActP and XylFGH proteins, respectively. Acetate reaches TCA cycle after degradation by an acetate synthetase (acs), whereas xylose successively enters the PPP, EMP pathway and TCA cycle after degradation via the enzymes XylA (xylose isomerase) and XylB (xylose kinase). This translates into the transition from

truncated peak P2 (Figure 2C) to truncated P2 peak featuring a shoulder and into the appearance of peak P3 (Figure 2D–H) as a result of expelled acetate and xylose catabolism, respectively. It is stressed that the degradation of acetate occurs prior to that of xylose even though the expression of the *act* operon is concomitant to that of *xyl* operon (see the sequential appearance of the P2 shoulder and P3). This phenomenon is related to the short adaptation phase of glucose-acetate transition (i.e., 10–40 min) compared to that of the glucose-xylose (i.e., 1.8–5.8 h) in *E. coli* [49,50]. When the glucose concentration becomes too low, the P2 peak disappears due to resulting insufficient amount of energy to sustain light production in emission mode 2. The truncation and shoulder observed previously on the P2 signal then appear on the P1 signal, which leads to a decrease in its magnitude (Figure 2I–L). Under these conditions, the stringent response and catabolite repression occur simultaneously.



**Figure 9.** Schematic representation of the mechanisms underlying sugar degradation at sufficiently low glucose concentrations (low  $x$ ), which leads to the appearances of the P2 shoulder/P2 doublet and P3 peak. Under such  $x$ -conditions, glucose is transported into the cell and degraded to produce the energy required for light emission in modes 1 and 2 (P1 and P2, respectively), as detailed in Figure 8. In parallel, acetate originating from glucose breakdown is expelled from the cell. A low glucose concentration leads to a lower amount of non-phosphorylated EIIA proteins and thus to a lower inhibition of adenylate cyclase. The concentration level of cAMP thus increases, which allows for the formation of the cAMP/Crp complex and the activation of the simultaneous transcriptions of the acetate and xylose operons (albeit at different rates) necessary for their intracellular transport and degradation. Abbreviations: PE-P, phosphoenolpyruvate; Glc-6P, Glucose 6-phosphate; EMP, Embden–Meyerhof–Parnas pathway; PPP, the pentose phosphate pathway; AcCoA, acetyl CoA; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle; AC, adenylate cyclase; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; Crp, cAMP receptor protein; ActP, cation/acetate symporter. The inset displays the time-dependent luminescence response corresponding to the molecular mechanisms highlighted in the scheme, with the P2 shoulder originating from the acetate that is metabolized by cells.

The increase in  $\mathcal{L}um_{max,1}$  with decreasing glucose concentration from  $x = 1$  to 0.2 and the presence of local maxima for  $\mathcal{L}um_{max,1}$  at  $x = 0.16$  and 0.06 (Figure 5A) suggest that the hierarchical utilization of sugars (as possibly inferred from the sequential appearance of P2 shoulder and peak P3) does not proceed according to an ‘on/off’ process. Instead, cells likely use the different carbon sources at their disposal depending on demand and

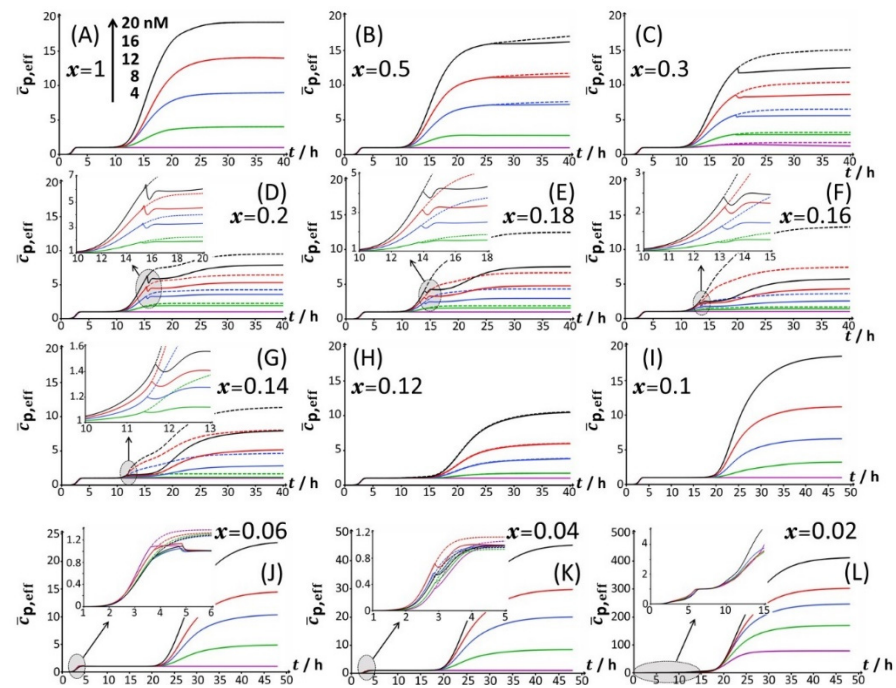
energy trade-offs (e.g., use of glucose/acetate or glucose/xylose for  $0.06 < x < 1$  and use of glucose/xylose/acetate under conditions corresponding to local maxima in  $\mathcal{Lum}_{\max,1}$ ), as shown in Figure 9. In agreement with our observations, several studies have evidenced that bacterial response to changes in energy supply should be viewed as a continuous process rather than a threshold phenomenon, especially in carbon-limited cultures [51,52]. When glucose concentration is sufficiently low, the cAMP level increases and the cAMP–Crp complex can then simultaneously induce the transcriptions of both acetate and xylose operons and the synthesis of the enzymes necessary for their respective catabolism. Most importantly, the rate of transcriptions of these two operons may differ (Figure 9), which agrees with a continuous rather than an ‘on/of’ use of distinct carbon sources.

Another possibility, supported by the recent observations by Barthe et al. [50], is the existence of subpopulations of cells during their adaptation to a transition from glucose to xylose carbon sources. The related phenotypic heterogeneity in the use of substrates during the diauxic batch culture of a monoclonal population is related to the intracellular availability of XylR that controls the length of catabolite repression phase and therefore mediates the emergence of subpopulations able to handle xylose [50]. This mechanism leads to a transition phase where both glucose and xylose may be jointly exploited by distinct cell populations.

#### 4.4. On the Connection between Bioluminescence Response of Metal-Sensing Cells, Cell Photoactivity and Nutrient Conditions

Using the theory detailed in Section 3.1 and following the methodology for bioluminescence signal analysis described in Section 3.2, the time-dependent bioluminescence response of metal-sensing cells measured in 0.1% tryptone (Figures 2–4) could be successfully reconstructed for all tested Cd concentrations and glucose-to-xylose concentration ratios. Supplementary Table S1 specifies values of the root mean square error (RMSE) underlying the quality of the theoretical reconstructions of the measured bioluminescence signals for  $0 < t < 48$  h at all values of  $x$  and total Cd concentration adopted in this work. The fitting of the bioluminescence profiles to theory is reported in Figures 2–4 (solid lines therein), and the corresponding dependence of the dimensionless cell photoactivity on time,  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  (Equation (10)) as retrieved from fitting of the cell response to Equation (9), is given in Figure 10 for each examined condition. For the sake of completeness, we mention that successful confrontations between theoretical formalism and bioluminescence signals monitored in 0.15% and 0.1% LB media were also achieved (solid lines in Figures S2 and S3), and related time-dependent cell photoactivity patterns are shown in Figures S7 and S8 for all tested values of  $x$  and  $c_{\text{Cd}}^*$ . At a fixed Cd concentration and  $x$ , the sequential appearance of  $m$  (non-truncated and non-doubled) bioluminescence peaks (with  $m = 1, 2$  or 3 corresponding to peaks P1, P2 and/or P3 depending on  $x$ ) was reflected by a  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  that increases with time according to  $m$  successive sigmoid-like functions. The latter functions feature non-zero plateau values marking the transition between two successive peaks, and the plateau  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t \rightarrow \infty)$  corresponds to the bioluminescence response at  $t \rightarrow \infty$  where  $\mathcal{Lum}(t \rightarrow \infty) \rightarrow 0$ . These properties are the direct consequence of the convolution product that defines  $\mathcal{Lum}(t)$  (Equation (1)), and they further agree with the  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  features revealed for bimodal stringent-controlled signals [32]. This convolution product finds its physical origin in the finite timelapse (denoted as  $\tau_q$  in Section 3), during which an excited luciferase–hydroxyflavin complex can emit photons before its rate of photon production goes to 0 [14]. The resulting bioluminescence at time  $t$  is then proportional to the time-dependent concentration of photon emitters between 0 and  $t$  (emitters being operational during a timelapse  $\tau_q$ ), and this concentration varies with time according to  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$ . Of interest here is the way the truncation of peak P2 (see Section 4.2) resulting from the glucose-mediated repression of acetate (Section 4.3) is reflected in the  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  profile. Figure 10C clearly shows that for a bimodal P1-truncated P2 signal (Figure 2C), the truncation of peak P2 leads to a discontinuous decrease in  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  with time followed by a plateau value reached when bioluminescence approaches a value of 0. When there is repression of

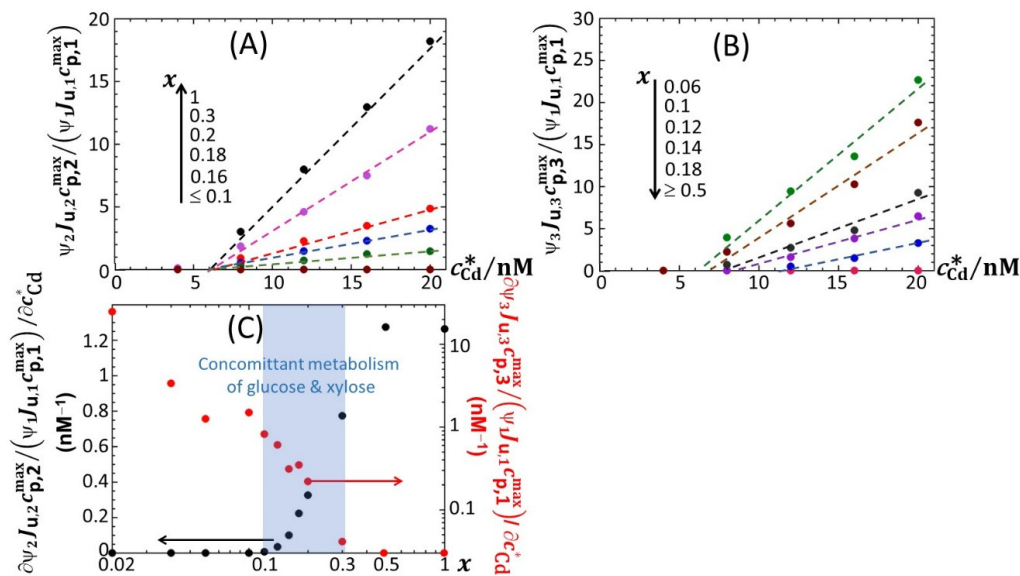
acetate by glucose and subsequent use of acetate by the cells (Figure 2D), the corresponding truncation of peak P2 and the appearance of a shoulder in that peak give rise to a local minimum in  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$ , as pictured in the inset of Figure 10D. The depth of that minimum further increases with increasing  $c_{\text{Cd}}^*$ . Similar features apply for  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  corresponding to a truncated P1 signal (as observed at sufficiently low  $x$ , see Figures 2J,K and 4B,C) due to early catabolite repression (Figure 10J,K). The effects of truncation of P2 and P1 peaks on  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  can be further appreciated in Figure 10 by comparing the theoretical results derived from proper reconstruction of the bioluminescence signal (solid lines) with those generated for the scenario where peak truncation is absent. Concretely, the latter results are obtained by replacing the time component of  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  adopted to recover the observed truncation by a value of 0.



**Figure 10.** Dependence of the cell photoactivity  $\bar{c}_{p,\text{eff}}$  (Equation (10)) on time  $t$  and total bulk Cd concentration (specified) in 0.1% tryptone for different glucose-to-xylose concentration ratios corresponding to  $0.02 \leq x \leq 1$  (indicated). The scale in Cd concentration and the associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B–L). Solid lines: cell photoactivity retrieved from the theoretical reconstruction of the measured time-dependent bioluminescence profiles displayed in Figure 2 following the methodology delineated in Section 3 (Equations (9) and (10)). Dotted lines correspond to predictions in the absence of truncation in peak P2 (panels (B–G)) and in peak P1 (panels (J,K)). The theoretical time-dependent bioluminescence patterns corresponding to the  $\bar{c}_{p,\text{eff}}$  data given in this Figure 10 are shown in Figure 2 (solid lines therein) and in Figures 3 and 4 where zooms of the P2 and P1 emission modes, respectively, are provided.

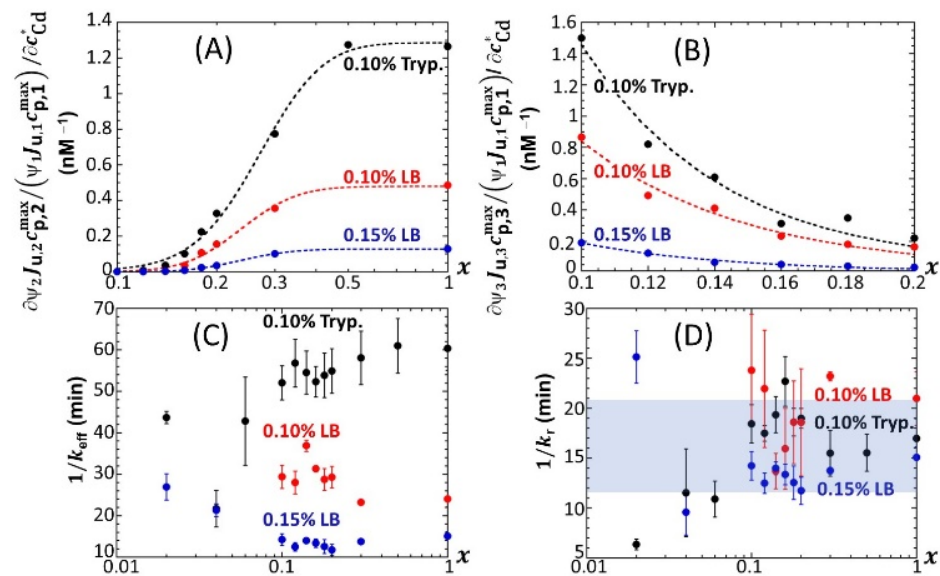
Now that the overall dependence of  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  on glucose concentration  $x$  has been discussed in connection with time-dependent bioluminescence profiles and the modality/truncation thereof, we comment on the dependence of  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  on  $c_{\text{Cd}}^*$  at selected values of  $t$  and  $x$ . For  $x \geq 0.1$ , the first sigmoidal component of  $\bar{c}_{p,\text{eff}}$  corresponding to emission mode 1 (denoted as  $\bar{c}_{p,1}(t)$  in Equation (10)) is found to not depend on  $c_{\text{Cd}}^*$ . This finding directly follows Equations (9) and (10) for scenarios where cell photoactivity in emission mode 1 is not significantly affected by Cd ions in solution via, e.g., Cd-mediated hormetic or toxic effects. It further supports the applicability of the linear Henry regime for metal biouptake flux and that of the linear Hill regime for the production of reporter proteins, both being considered in the derivation of Equation (1) [14]. The applicability of these regimes ensure indeed that bioluminescence at any time  $t$  (which includes  $\mathcal{L}_{\text{um,max},i=1,2,3}$ )

linearly grows with  $c_{Cd}^*$  unless  $\bar{c}_{p,eff}(t)$  is affected by  $c_{Cd}^*$  following hormesis or toxicity effects. It is only for cases where truncation of peak P1 is observed that  $\bar{c}_{p,eff}(t)$  is significantly impacted by  $c_{Cd}^*$  (Figure 10J,K). For such poorly nutritive conditions marked by an early catabolite repression, the energy demands by the cells are not properly satisfied to sustain the reporter gene expression at a maximal rate, recalling that the latter increases with  $c_{Cd}^*$ . Again, this result illustrates the subtle interplay between metal bioavailability in solution and the required bioavailability of nutrients for the cells to efficiently translate the supplied chemical information (i.e., the bioaccumulated amount of metal ions) into light. This point is further strengthened by examining the dependence of the dimensionless ratios  $\frac{\Psi_{i=2,3}J_{u,i=2,3}c_{p,i=2,3}^{max}}{\Psi_1J_{u,1}c_{p,1}^{max}}$  (Equation (10)) on  $c_{Cd}^*$  and  $x$  (Figure 11A,B). To simplify notations, we hereafter denote this ratio as  $R_{i=2,3}$ . Qualitatively, the changes in  $R_{i=2,3}$  with varying  $x$  at fixed  $c_{Cd}^*$  are found to mirror those observed for  $\mathcal{L}um_{max,i=1,2,3}$  in Figure 6. Namely, the decrease (increase) in  $R_2$  ( $R_3$ , respectively) with decreasing  $x$  accompanies the gradual vanishing and appearance of peaks P2 and P3, respectively, considering that the corresponding variations of bioluminescence in emission mode 1 (when it is significantly operative, i.e., for  $0.06 < x < 1$ ) at fixed  $c_{Cd}^*$  are less pronounced than those in modes 2 and 3 (Figure 6). We further found that  $R_{i=2,3}$  linearly increase at fixed value of  $x$  with increasing  $c_{Cd}^*$  above the minimal Cd-concentration values required for light induction and identified in Figure 6B,C. This result contrasts with the increase in  $\log(R_2)$  with  $c_{Cd}^*$  measured in LB media for another *lux*-CDABE biosensor constructed from the JW3596 *E. coli* strain [32]. Assuming that the ratios  $(\Psi_{i=2,3}J_{u,i=2,3})/(\Psi_1J_{u,1})$  do not significantly depend on  $c_{Cd}^*$  (see definitions of  $\Psi_{i=1,2,3}$  and  $J_{u,i=1,2,3}$  given in Section 3), the observed linearity of  $R_{i=2,3}$  with  $c_{Cd}^*$  then necessarily stems from a linear increase in  $c_{p,i=2,3}^{max}/c_{p,1}^{max}$  with increasing  $c_{Cd}^*$  at fixed  $x$ . Stated differently, the medium can sustain a maximum size of photoactive cell population (the medium carrying capacity) in emission modes 2–3 that more strongly increases with  $c_{Cd}^*$  than the carrying capacity in mode 1 does. For the sake of completeness, the  $\partial R_i/\partial c_{Cd}^*$  slopes are reported in Figure 11C versus  $x$ . As discussed in Section 4.3, these data support the co-utilization of glucose and xylose by the biosensors in the range of  $0.1 < x < 0.3$ . Analogous conclusions can be drawn for 0.15% and 0.1% LB media (Figures S9 and S10, respectively).



**Figure 11.** (A,B) Dependence of the ratios  $R_{i=2,3} = \frac{\Psi_{i=2,3}J_{u,i=2,3}c_{p,i=2,3}^{max}}{\Psi_1J_{u,1}c_{p,1}^{max}}$  on  $c_{Cd}^*$  for selected values of  $x$  in 0.1% tryptone. (C) Slopes of the linear variations of  $R_i$  with  $c_{Cd}^*$  reported as a function of  $x$  in 0.1% tryptone. The blue-shaded zone identifies the range of  $x$  values where cells concomitantly metabolize glucose and xylose. Data in this figure originate from those given in Figures 2, S2 and S3 (corrected for the corresponding reference at 0 nM Cd concentration).

For the sake of comparison, Figure 12A,B shows the slopes  $\partial R_{i=2,3}/\partial c_{Cd}^*$  as a function of  $x$  for  $0.1 \leq x \leq 1$  in 0.1% tryptone, 0.1% LB and 0.15% media. The new feature revealed here is a decrease in the biosensor performance (at any  $x$ ) from mode 1 to mode 2 (Figure 12A) and from mode 1 to mode 3 (Figure 12B) upon replacing the 0.1% tryptone medium with a 0.1% LB or 0.15% LB medium. Among the three tested media, the 0.15% LB solution is the one with the highest nutritional quality for cells that operate in mode 1 [46]. This is materialized by values of  $\partial \mathcal{Lum}_{max,1}/\partial c_{Cd}^*$  that are highest in 0.15% LB under all  $c_{Cd}^*$  and  $x$  conditions tested (Figure 7A). As a result, unlike in 0.1% LB or 0.1% tryptone, a gain in biosensor performance when passing from mode 1 to mode 2 or to mode 3 becomes more difficult to achieve in the 0.15% LB medium that already features the best biosensor performance in mode 1. In turn, the increase in the carrying capacity ratios  $c_{p,i=2,3}^{max}/c_{p,1}^{max}$  with  $c_{Cd}^*$  (which determines  $\partial R_{i=2,3}/\partial c_{Cd}^*$  provided that  $(\Psi_{i=2,3}J_{u,i=2,3})/(\Psi_1J_{u,1})$  does not depend on  $c_{Cd}^*$ ; see argument above) is more important in 0.1% tryptone than it is in 0.1% and 0.15% LB. Interestingly, the timescale  $1/k_{eff}$  (Equation (7)) evaluated from the modeling of the bioluminescence signals (Section 3.2) is found to significantly decrease at any  $x$  when shifting from 0.1% tryptone to 0.15% LB (Figure 12C), i.e., when significantly increasing the rate of light production per unit metal concentration in mode 1 (Figure 7A) (it is in this mode that  $1/k_{eff}$  is estimated; see Section 3.2). This observation qualitatively conforms with the dependence  $1/k_{eff} \propto 1/k_e$  evidenced by Equation (7). Indeed, a higher rate of light production is associated with a higher rate of transcription of *zntA* that codes a P-type ATPase pump involved in Cd efflux. This in turn facilitates Cd excretion, which comes to effectively increase  $k_e$  and therefore decrease  $1/k_{eff}$ . This feature, however, cannot explain on its own the significant decrease in  $1/k_{eff}$  when moving from 0.1% tryptone to 0.1% LB (Figure 12C) because the  $\partial \mathcal{Lum}_{max,1}/\partial c_{Cd}^*$  achieved in these media is of the same order of magnitude (Figure 7A). This latter decrease in  $1/k_{eff}$  from the 0.1% tryptone to 0.1% LB media can be understood from Equation (7) and the dependence of  $1/k_{eff}$  on Cd speciation features in solution via the quantity  $p$  that ranges from unity for inert metal complexes to  $(1 + \epsilon \bar{K}_s)$  for fully labile complexes. Indeed, Cd binding to charged molecules or particles is known to be essentially driven by (attractive) electrostatics, which favors the lability of complexes with faster interconversion between free and complexed metal forms [53]. Given the respective compositions of LB and tryptone media, it is further expected that the stability constant  $\bar{K}_s$  (which involves the concentration of ligand) would be higher in 0.1% LB than in 0.1% tryptone. In turn, the parameter  $p$  would likely be larger in the former medium, which would lead to a lower  $1/k_{eff}$  (see Equation (7)), in line with data in Figure 12C. In practice, both impacts of medium composition on  $k_e$  and  $p$  discussed above probably jointly determine  $1/k_{eff}$ . This discussion, even qualitative, may suggest plausible leading-order mechanisms consistent with the  $1/k_{eff}$  sequence displayed in Figure 12C at fixed  $x$ . Within the error bars,  $1/k_{eff}$  does not significantly vary with decreasing  $x$  from unity to 0.1, and values corresponding to  $x < 0.1$  should be considered with caution due to the truncation or even doubling of peak 1 (Figure 4), which increases the required parametrization level of  $\bar{c}_{p,1}(t)$  at  $x < 0.1$ . The error bars in Figure 12C represent the dispersion in  $1/k_{eff}$  values estimated over the 0–20 nM range in Cd concentration: no obvious dependence of  $1/k_{eff}$  on  $c_{Cd}^*$  can be identified, and a similar conclusion holds for  $1/k_r$ , in line with results reported elsewhere [32]. For  $0.1 < x < 1$ , the magnitude of  $1/k_r$  (~10–20 min) found for the three tested media is consistent with that given in our previous work conducted on another *lux*-CDABE *E. coli* biosensor in a medium lacking xylose [32]. This magnitude is further in agreement with the half-life of luciferase proteins reported by Koga et al. from in vitro experiments [54].



**Figure 12.** (A,B) Slopes of the linear variations of  $R_{i=2,3} = \frac{\Psi_{i=2,3} J_{u,i=2,3} c_{p,i=2,3}^{\max}}{\Psi_{1} J_{u,1} c_{p,1}^{\max}}$  with  $c_{Cd}^*$  reported as a function of  $x$  in 0.1% tryptone, 0.1% LB and 0.15% LB media (indicated). Values of the timescales (C)  $1/k_{\text{eff}}$  and (D)  $1/k_r$  as retrieved from recovery of measured time-dependent bioluminescence profiles (corrected for the corresponding reference measured at 0 nM concentration) with theory over the range of  $x$  conditions tested in 0.1% tryptone, 0.1% LB and 0.15% LB media (indicated). See text and Section 3 for details.

## 5. Conclusions

In this work, we provide a full analysis of the bioluminescence signals produced over time by Cd-detecting *luxCDABE E. coli* sensors in media where glucose carbon source is gradually replaced by xylose in the presence of amino acids brought by tryptone or LB. Under conditions where the glucose resource is not limited, the bioluminescence signal exhibits a sequence of two successive bell-shaped peaks P1 and P2 resulting from amino acid absorption and stringent cell response, respectively. Upon setting the biosensors in media where the carbon source is significantly shifted from glucose to xylose, a clear truncation of the peak P2 is observed as a result of acetate repression by glucose. Under such conditions, xylose repression by glucose is also operational. A doubling of peak P2 is even observed when the shortage in glucose is so severe that the repression of acetate is stopped and acetate becomes actively metabolized by the cells in replacement of glucose. These features are accompanied by a progressive extinction of peak P2 with decreasing glucose concentration below a threshold value (i.e., with significantly increasing xylose concentration) and by the joint appearance (at longer timescales) of a third peak P3 due to the utilization of xylose after the cells have ended their xylose-mediated repression effective at larger glucose concentrations. The resulting P1–P3 bimodal signal with xylose as the carbon source then constitutes the pendant of the P1–P2 bimodal signal triggered by the stringent cell response in media containing glucose in excess over xylose. The truncation, doubling and extinction of peak P1 are observed with further increasing xylose concentration as glucose concentration then becomes too low to sustain amino acid absorption and subsequent light production. The respective biosensor performances estimated from the rates of increase in the detected peak maxima with increasing Cd concentration are further discussed as a function of glucose-to-xylose concentration ratio and expected differences in metal speciation in tryptone- and LB-containing media. The analysis highlights the requirement to invoke both nutrient bioavailability/quality and metal bioavailability for a qualitative capture of the respective dependence of the bioluminescence signals on Cd concentration within the emission modes corresponding to peaks P1, P2 and P3. The discussion is further supported by a successful confrontation between measured bioluminescence data and

theoretical formalism, as well as the subsequent derivation of the time-dependent cell photoactivity profiles for all examined media compositions. The analysis again highlights the intrinsic dual components of the bioluminescence response, i.e., metal bioavailability properties in solution, and supply by the medium of the energy required for cells to sustain metal-triggered light production. Based on the reported findings, we may state that the detection of  $\text{Cd}^{2+}$  by the biosensor of interest in this work is best performed upon analysis of the response in the P1–P2 (bimodal signal), P1–P2–P3 (trimodal signal) or P1–P3 (bimodal signal) configurations depending on nutritional medium quality. In support of this recommendation, our results illustrate how the lower detection limit (or sensitivity) can be tuned when switching from P1 to P2/P3 peak signals and how the amplitude of the considered peak (and therefore the signal-to-noise ratio) can be changed from one mode of emission to the other. In turn, a concomitant exploitation of these properties and of the linear relationships established between peak amplitude and metal concentration offers a panel of options to efficiently track  $\text{Cd}^{2+}$  at an optimized quantitative level. This is clearly an advantage over current practice where metal detection is often addressed from the only exploitation of a single bioluminescence peak signal.

Though the focus of this study is on the effects of nutritional conditions on the multimodality of bioluminescence emission patterns, forthcoming contribution from our group will delineate a strategy to connect (on a quantitative level) metal bioavailability properties and the time–response of luminescent metal whole-cell biosensors without the recourse to calibration protocol and without the common but questionable assumption of Biotic Ligand Model validity. As shown in the current study, the method will include the necessary estimation of cell photoactivity dependence on time via a proper normalization and time deconvolution of the cell signal.

This study demonstrates the proof-of-concept for modifying on demand bioluminescence signals generated by whole-cell metal biosensors upon exploiting the dependence of cell photoactivity on nutrient medium conditions. The modifications apply to the number, position, shape and magnitude of the bioluminescence peaks sequentially measured over time, each peak being the characteristic signature of a specific cell metabolism. In turn, these results open perspectives in terms of the detection of the toxicity of contaminants by metal-responsive bioluminescent sentinels as a function of pristine cell metabolisms. Such perspectives should help to extend current practice mostly restricted to the measurement of the decay in bioluminescence signal amplitude arbitrarily selected at a fixed timepoint with increasing toxicant concentration.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/bios12050327/s1>. In the Supporting Information, we provide the equivalents of Figures 2, 5, 6, 10 and 11 for 0.10% and 0.15% LB media (Figures S2–S10); in Figure S1, we provide an illustrative bioluminescence dataset that is uncorrected for the reference signal measured in the absence of Cd; and in Table S1, we provide the root mean square error values associated with the fitting of the data in Figure 2 to Equations (9) and (10). All raw bioluminescence data reported in this work are available upon request, as is the PTC Mathcad Prime code developed for the theoretical analysis of the time-dependent bioluminescence response.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.P. and J.F.L.D. Methodology, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Software, J.F.L.D.; Validation, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Formal Analysis, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Investigation, E.D., C.P., M.Z. and J.F.L.D.; Data Curation, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Writing—Original Draft Preparation, J.F.L.D.; Writing—Review and Editing, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Supervision, C.P. and J.F.L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** JFLD is grateful to French national EC2CO program and OTELO (Observatoire Terre Environnement Lorraine) for fundings.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.



**Data Availability Statement:** All raw bioluminescence data reported in this work are available upon request, as is the PTC Mathcad Prime code developed for the theoretical analysis of the time-dependent bioluminescence response.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ferrari, A.G.-M.; Carrington, P.; Rowley-Neale, S.J.; Banks, C.E. Recent advances in portable heavy metal electrochemical sensing platforms. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2020**, *6*, 2676–2690. [CrossRef]
2. Xu, X.; Chen, S.; Ren, L.; Han, C.; Lv, D.; Zhang, Y.; Ai, F. Estimation of heavy metals in agricultural soils using vis-NIR spectroscopy with fractional-order derivative and generalized regression neural network. *Remote Sens.* **2021**, *13*, 2718. [CrossRef]
3. Shin, H.J. Genetically engineered microbial biosensors for in situ monitoring of environmental pollution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 867–877. [CrossRef] [PubMed]
4. Rensing, C.; Maier, R.M. Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2003**, *56*, 140–147. [CrossRef]
5. Hassan, S.H.A.; Van Ginkel, S.W.; Hussein, M.A.M.; Abskharon, R.; Oh, S.-E. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. *Environ. Int.* **2016**, *92–93*, 106–118. [CrossRef]
6. Guo, M.; Du, R.; Xie, Z.; He, X.; Huang, K.; Luo, Y.; Xu, W. Using the promoters of MerR family proteins as “rheostats” to engineer whole-cell heavy metal biosensors with adjustable sensitivity. *J. Biol. Eng.* **2019**, *13*, 70. [CrossRef]
7. Hakkila, K.; Maksimow, M.; Karp, M.; Virta, M. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal. Biochem.* **2002**, *301*, 235–242. [CrossRef]
8. Sagi, E.; Hever, N.; Rosen, R.; Bartolome, A.J.; Rajan Premkumar, J.; Ulber, R.; Lev, O.; Scheper, T.; Belkin, S. Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. *Sens. Actuators B Chem.* **2003**, *90*, 2–8. [CrossRef]
9. Li, Y.-F.; Li, F.-Y.; Ho, C.-L.; Liao, V.H.-C. Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environ. Pollut.* **2008**, *152*, 123–129. [CrossRef]
10. van Leeuwen, H.P.; Town, R.M.; Buffle, J.; Cleven, R.F.M.J.; Davison, W.; Puy, J.; van Riemsdijk, W.H.; Sigg, L. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 8545–8556. [CrossRef]
11. Duval, J.F.L. Chemodynamics of Metal Ion Complexation by Charged Nanoparticles: A dimensionless rationale for soft, core-shell and hard particle types. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 11802–11815. [CrossRef] [PubMed]
12. Duval, J.F.L.; Town, R.M.; van Leeuwen, H.P. Lability of nanoparticulate metal complexes at a macroscopic metal responsive (bio)interface: Expression and asymptotic scaling laws. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 6052–6065. [CrossRef]
13. Pagnout, C.; Présent, R.M.; Billard, P.; Rotureau, E.; Duval, J.F.L. What do luminescent bacterial metal-sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *270*, 482–491. [CrossRef]
14. Duval, J.F.L.; Pagnout, C. Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting whole-cell bacterial sensors. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 1373–1383. [CrossRef] [PubMed]
15. Van Leeuwen, H.P. Metal speciation dynamics and bioavailability: Inert and labile complexes. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3743–3748. [CrossRef]
16. Liu, F.; Tan, Q.-G.; Weiss, D.; Crémazy, A.; Fortin, C.; Campbell, P.G.C. Unravelling metal speciation in the microenvironment surrounding phytoplankton cells to improve predictions of metal bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54*, 8177–8185. [CrossRef]
17. Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J.; Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the biotic ligand model. *Environ. Chem.* **2005**, *2*, 9–24. [CrossRef]
18. Song, N.; Zhong, X.; Li, B.; Li, J.; Wei, D.; Ma, Y. Development of a multi-species biotic ligand model predicting the toxicity of trivalent chromium to barley root elongation in solution culture. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105174. [CrossRef]
19. Jeong, B.; An, J.; Nam, K. Time series analysis for determining ecologically acceptable Cu concentration from species sensitivity distribution with biotic ligand models in soil pore water. *Environ. Eng. Res.* **2021**, *26*, 200021. [CrossRef]
20. Clifford, M.; McGeer, J.C. Development of a biotic ligand model to predict the acute toxicity of cadmium to *Daphnia pulex*. *Aquat Toxicol.* **2010**, *98*, 1–7. [CrossRef]
21. Visual-MINTEQ Program. Available online: <https://vminteq.lwr.kth.se/> (accessed on 22 April 2022).
22. Magrissio, S.; Erel, Y.; Belkin, S. Microbial reporters of metal bioavailability. *Microb. Biotechnol.* **2008**, *1*, 320–330. [CrossRef] [PubMed]
23. Tecon, R.; Van der Meer, J. Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants. *Sensors* **2008**, *8*, 4062–4080. [CrossRef] [PubMed]
24. van der Meer, J.R.; Belkin, S. Where microbiology meets microengineering: Design and applications of reporter bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 511–522. [CrossRef] [PubMed]

25. Martín-Betancor, K.; Rodea-Palomares, I.; Muñoz-Martín, M.A.; Leganés, F.; Fernández-Piñas, F. Construction of a self-luminescent cyanobacterial bioreporter that detects a broad range of bioavailable heavy metals in aquatic environments. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 186. [[CrossRef](#)]
26. Blanco-Ameijeiras, S.; Cabanes, D.J.E.; Hassler, C.S. Towards the development of a new generation of whole-cell bioreporters to sense iron bioavailability in oceanic systems—learning from the case of *Synechococcus* sp. PCC7002 iron bioreporter. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 1291–1304. [[CrossRef](#)]
27. Wilkinson, K.J.; Buffle, J. Critical evaluation of the physicochemical parameters and processes for modelling the biological uptake of trace metals in environmental (aquatic) systems. In *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*; IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems; van Leeuwen, H.P., Köster, W., Eds.; John Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2004; p. 553.
28. Duval, J.F.L.; Rotureau, E. Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases: Impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 7401–7416. [[CrossRef](#)]
29. Kelly, C.J.; Hsiung, C.-J.; Lajoie, C.A. Kinetic analysis of bacterial bioluminescence. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 370–378. [[CrossRef](#)]
30. Delle Side, D.; Nassisi, V.; Pennetta, C.; Alifano, P.; Di Salvo, M.; Talà, A.; Chechkin, A.; Seno, F.; Trovato, A. Bacterial bioluminescence onset and quenching: A dynamical model for a quorum sensing-mediated property. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 171586. [[CrossRef](#)]
31. Abbas, M.; Adil, M.; Ehtisham-ul-Haque, S.; Munir, B.; Yameen, M.; Ghaffar, A.; Shar, G.A.; Asif Tahir, M.; Iqbal, M. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci. Total Environ.* **2018**, *626*, 1295–1309. [[CrossRef](#)]
32. Duval, J.F.L.; Pagnout, C. Bimodal stringency-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters: Experimental evidence and quantitative theory. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *309*, 127751. [[CrossRef](#)]
33. Shimada, T.; Tanaka, K. Use of a bacterial luciferase monitoring system to estimate real-time dynamics of intracellular metabolism in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 5960–5968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Brodl, E.; Winkler, A.; Macheroux, P. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 551–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lisitsa, A.E.; Sukovaty, L.A.; Kratasyuk, V.A.; Nemtseva, E.V. Viscous media slow down the decay of the key intermediate in bacterial bioluminescent reaction. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2020**, *492*, 162–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tinikul, R.; Chunthaboon, P.; Phonbuppha, J.; Paladkong, T. Bacterial luciferase: Molecular mechanisms and applications. In *The Enzymes. Flavin-Dependent Enzymes: Mechanisms, Structures and Applications*; Chaiyen, P., Tamanoi, F., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 47, pp. 427–455.
37. Rathnayake, I.V.N.; Megharaj, M.; Krishnamurti, G.S.R.; Bolan, N.S.; Naidu, R. Heavy metal toxicity to bacteria—Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? *Chemosphere* **2013**, *90*, 1195–1200. [[CrossRef](#)]
38. Li, B.; Zhang, X.; Tefsen, B.; Wells, M. From speciation to toxicity: Using a “Two-in-One” whole-cell bioreporter approach to assess harmful effects of Cd and Pb. *Water Res.* **2022**, *217*, 118384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nealson, K.H.; Eberhard, A.; Hastings, J.W. Catabolite repression of bacterial bioluminescence: Functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 1073–1076. [[CrossRef](#)]
40. Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K.A.; Tomita, M.; Wanner, B.L.; Mori, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 2006.0008. [[CrossRef](#)]
41. Riether, K.; Dollard, M.-A.; Billard, P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 712–716. [[CrossRef](#)]
42. Duval, J.F.L.; van Leeuwen, H.P. Rates of ionic reactions with charged nanoparticles in aqueous media. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 6443–6451. [[CrossRef](#)]
43. Duval, J.F.L. Dynamics of metal uptake by charged biointerphases: Bioavailability and bulk depletion. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7873–7888. [[CrossRef](#)]
44. Pinheiro, J.P.; Galceran, J.; Van Leeuwen, H.P. Metal speciation dynamics and bioavailability: bulk depletion effects. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 2397–2405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Haurlyuk, V.; Atkinson, G.C.; Murakami, K.S.; Tenson, T.; Gerdes, K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 298–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tomé, D. Yeast extracts: Nutritional and flavoring food ingredients. *ACS Food Sci. Technol.* **2021**, *1*, 487–494. [[CrossRef](#)]
47. Ishizuka, H.; Hanamura, A.; Kunimura, T.; Aiba, H. A Lowered concentration of CAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 341–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Shimada, T.; Nakazawa, K.; Tachikawa, T.; Saito, N.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Tanaka, K. Acetate overflow metabolism regulates a major metabolic shift after glucose depletion in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **2021**, *595*, 2047–2056. [[CrossRef](#)]
49. Enjalbert, B.; Letisse, F.; Portais, J.-C. Physiological and molecular timing of the glucose to acetate transition in *Escherichia coli*. *Metabolites* **2013**, *3*, 820–837. [[CrossRef](#)]
50. Barthe, M.; Tchouanti, J.; Gomes, P.H.; Bideaux, C.; Lestrade, D.; Graham, C.; Steyer, J.-P.; Meleard, S.; Harmand, J.; Gorret, N.; et al. Availability of the molecular switch *xylR* controls phenotypic heterogeneity and lag duration during *Escherichia coli* adaptation from glucose to xylose. *mBio* **2020**, *11*, e02938-20. [[CrossRef](#)]
51. Lendenmann, U.; Snozzi, M.; Egli, T. Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1493–1499. [[CrossRef](#)]

52. Okano, H.; Hermsen, R.; Kochanowski, K.; Hwa, T. Regulation underlying hierarchical and simultaneous utilization of carbon substrates by flux sensors in *Escherichia coli*. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 206–215. [[CrossRef](#)]
53. Degryse, F.; Smolders, E.; Merckx, R. Labile Cd complexes increase Cd availability to plants. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 830–836. [[CrossRef](#)]
54. Koga, K.; Harada, T.; Shimizu, H.; Tanaka, K. Bacterial luciferase activity and the intracellular redox pool in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genom.* **2005**, *274*, 180–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# Supplementary Materials

## Exploiting Catabolite Repression and Stringent Response to Control Delay and Multimodality of Bioluminescence Signal by Metal Whole-Cell Biosensors: Interplay between Metal Bioavailability and Nutritional Medium Conditions

Eva Delatour<sup>1</sup>, Christophe Pagnout<sup>1</sup>, Marie Zaffino<sup>1</sup> and Jérôme F.L. Duval<sup>2,\*</sup>

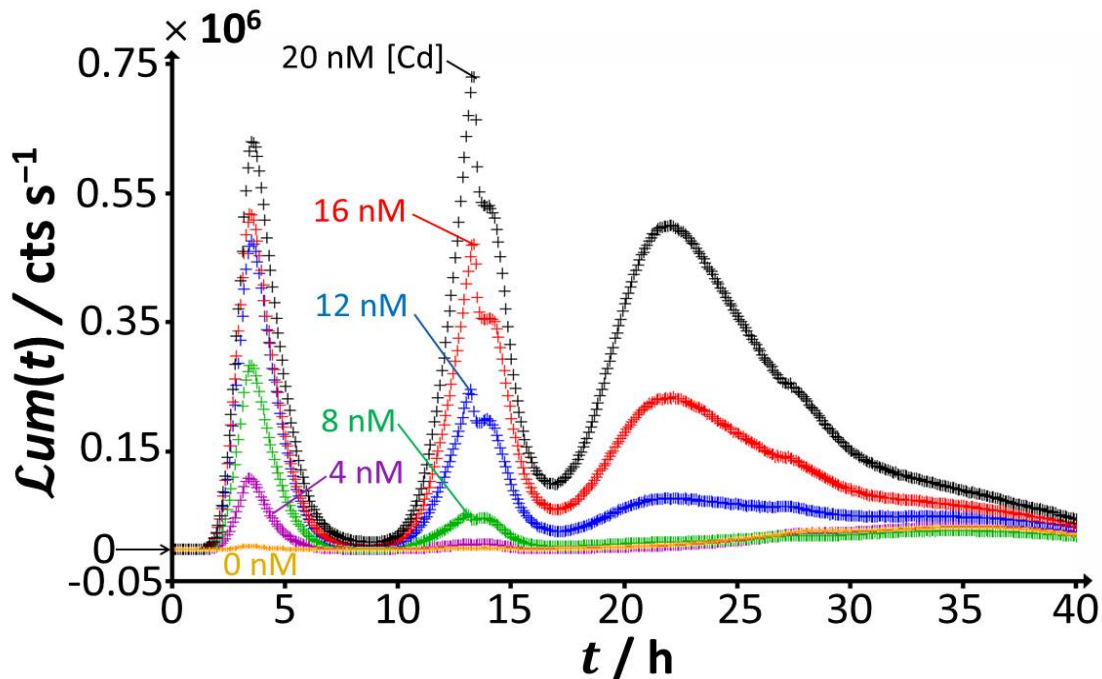
<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, F-57070 Metz, France

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, UMR7360, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

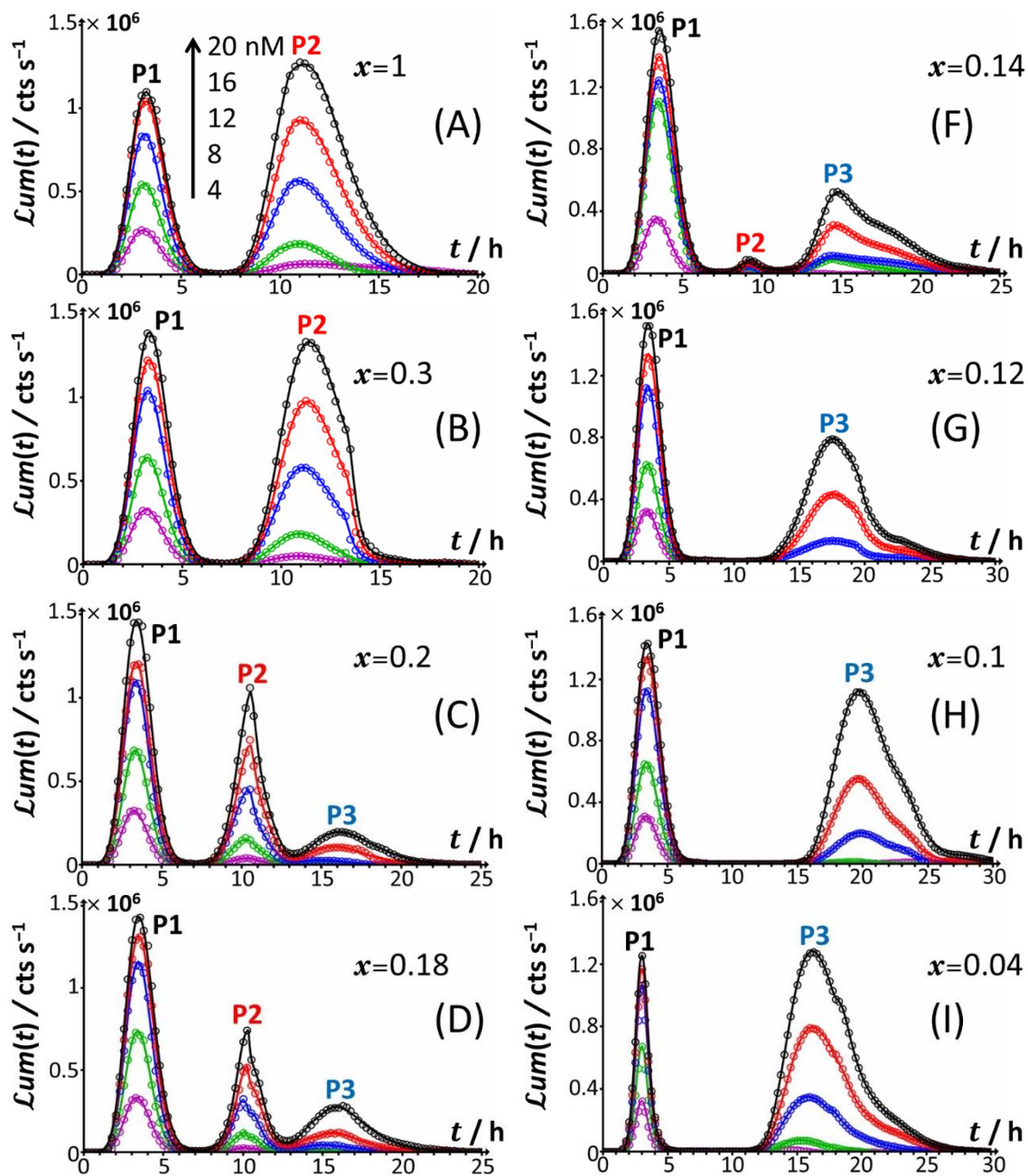
\*Correspondence: jerome.duval@univ-lorraine.fr

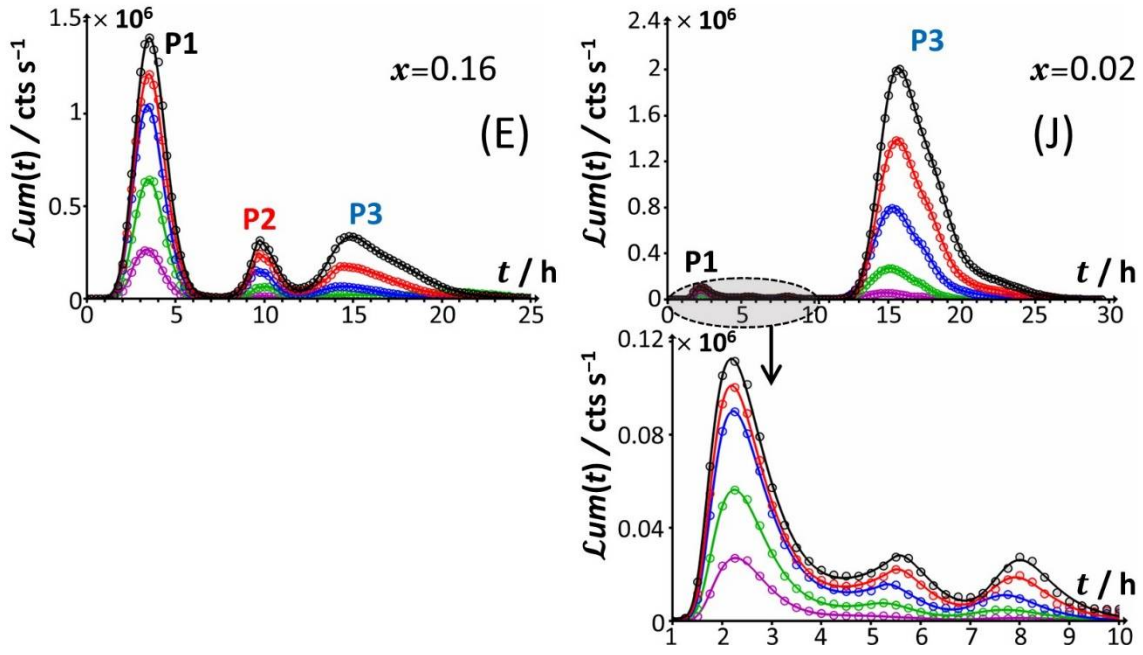
This document contains 10 Supplementary Figures and 1 Supplementary Table.

### Supplementary figures (Figures S1–S10).

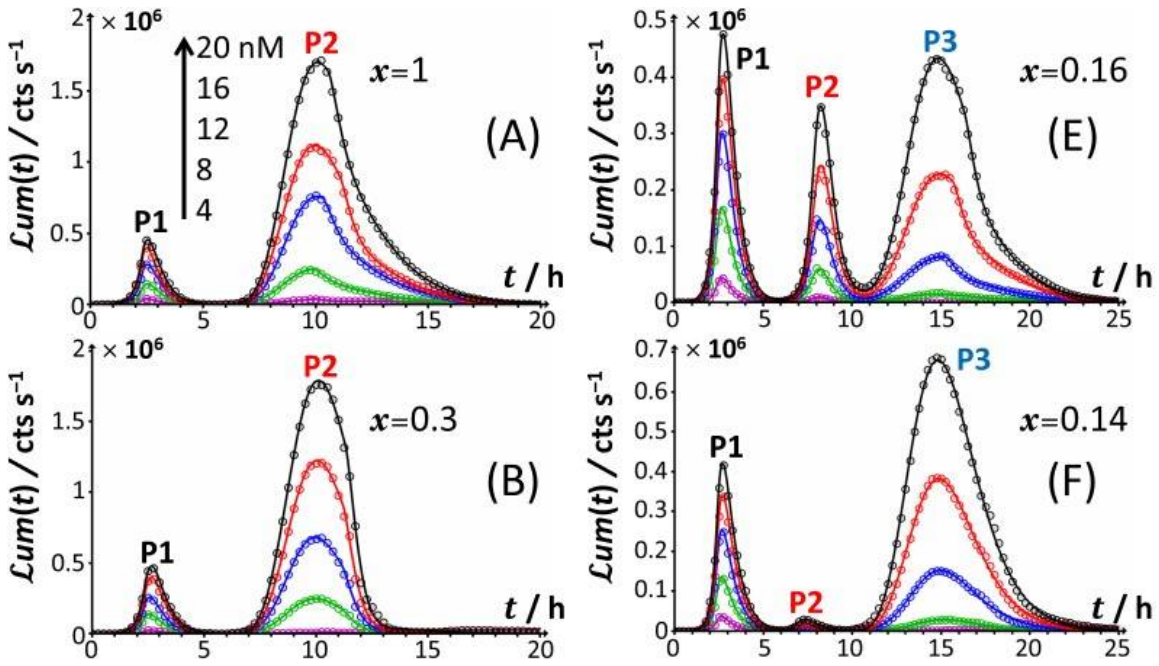


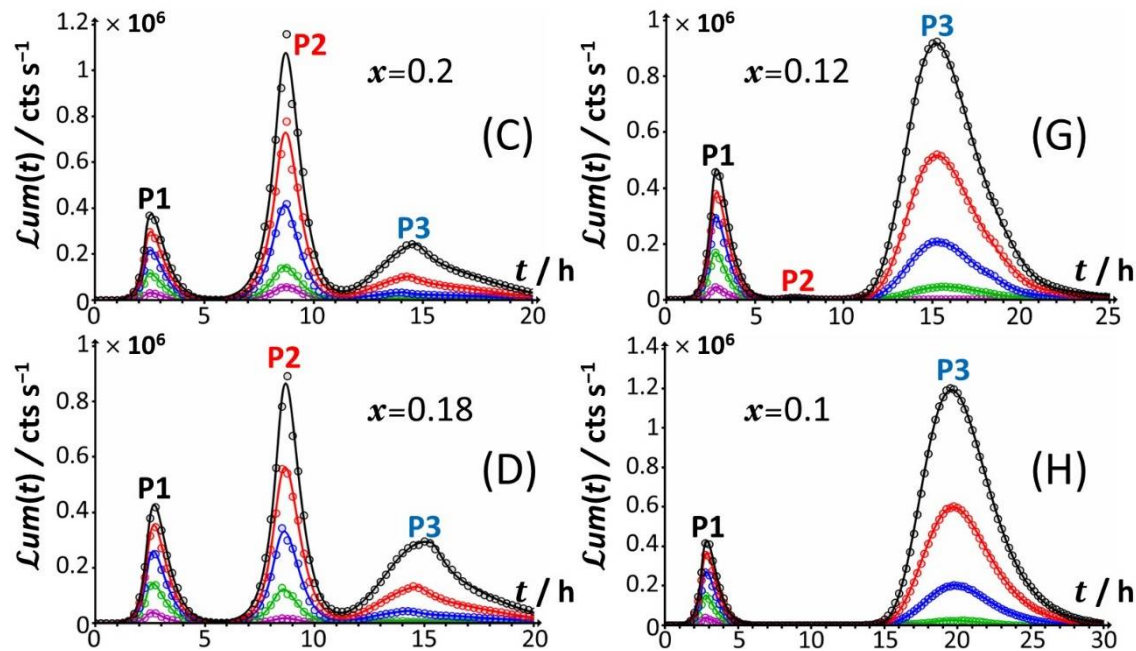
**Figure S1.** Time dependence of bioluminescence ( $\mathcal{L}um(t)$  in counts  $s^{-1}$ ) measured for the Cd-responsive *E. coli* biosensor as a function of total Cd concentration in the range 0-20 nM (indicated) in nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and with concentrations of glucose and xylose corresponding to  $x=0.16$ . In this figure, bioluminescence signals are **not** corrected for the cell response measured in 0 nM Cd.



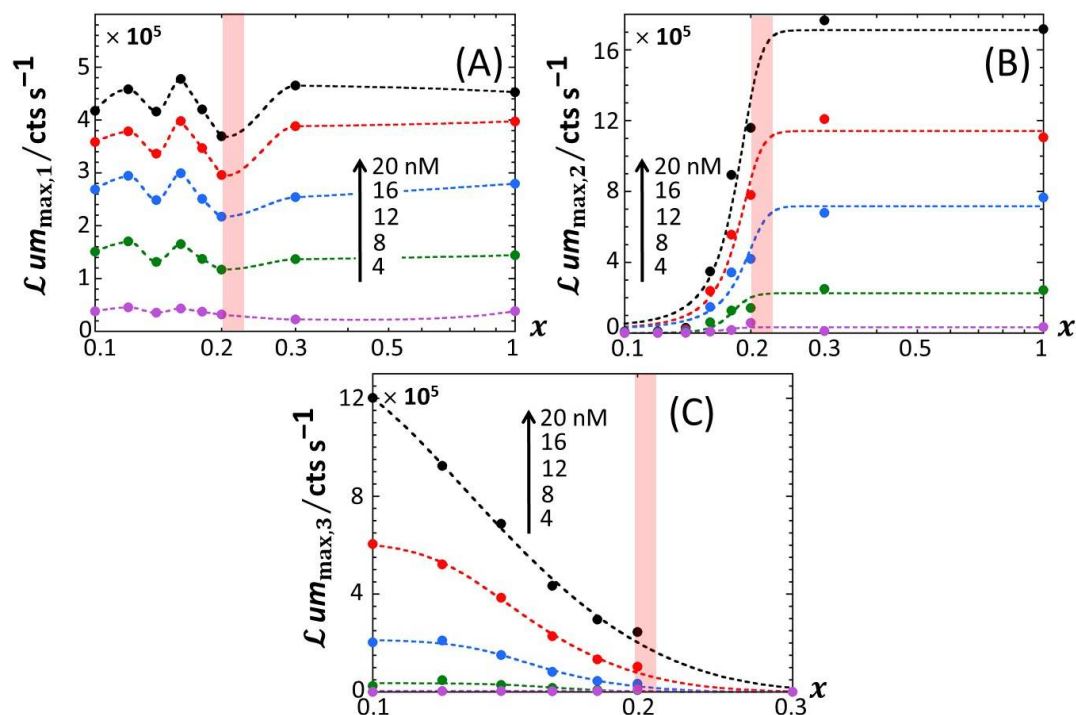


**Figure S2.** Time dependence of bioluminescence ( $Lum(t)$  in counts  $s^{-1}$ ) measured for the Cd-responsive *E. coli* biosensor as a function of total Cd concentration in the range 0-20 nM (indicated) in nGGM media supplemented with 0.15% LB and with different concentrations of glucose and xylose, subsumed in the variable  $x$  with  $0.02 \leq x \leq 1$ . The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B) to (J). Symbols (o): experimental data. Lines: reconstruction on the basis of the theory outlined in §3 of the main text. Signals are corrected by point-by-point subtraction of the corresponding cell response measured in 0 nM Cd concentration.



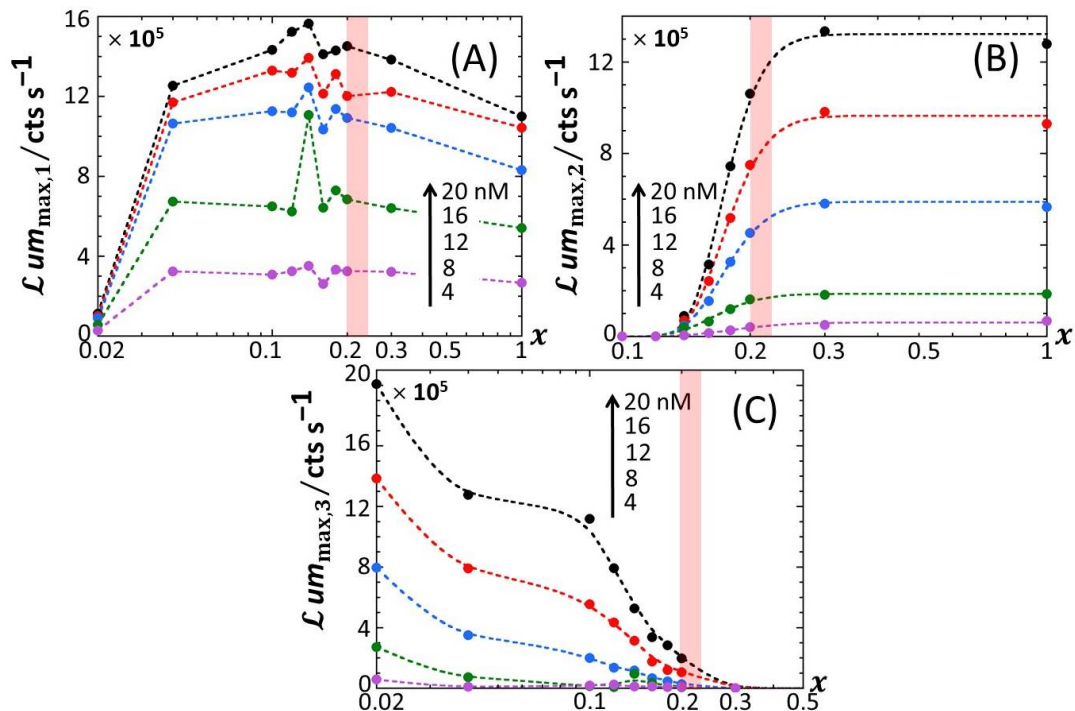


**Figure S3.** As in **Figure S2** except that the nGGM medium is here supplemented with 0.1% LB and with different concentrations of glucose and xylose as subsumed in the variable  $x$ , with  $0.1 \leq x \leq 1$ . Signals are corrected by point-by-point subtraction of the corresponding cell response measured in 0 nM Cd concentration.



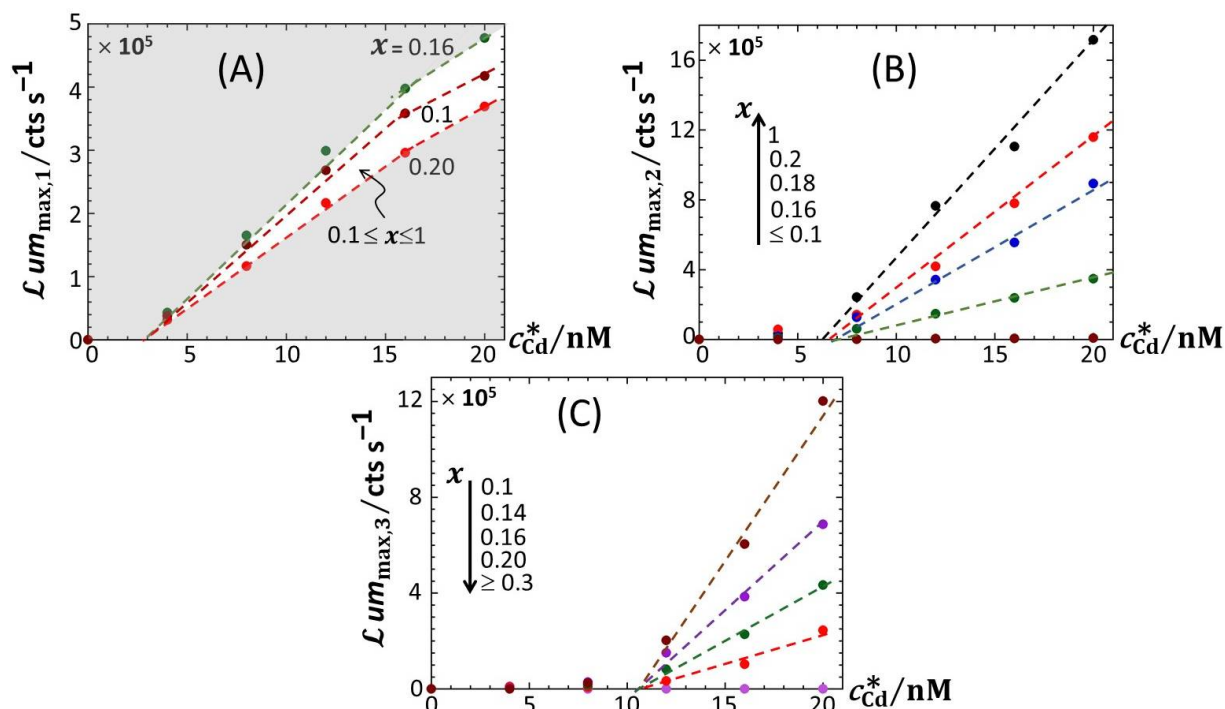
**Figure S4.** Variations of the maxima of the bioluminescence peaks P1 **(A)**, P2 **(B)** and P3 **(C)** with  $x$  and total Cd concentration in solution (indicated). The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in **(A)** apply to panels **(B)** and **(C)**. Symbols : experimental data. Lines: guides to the eyes. The red-colored zone indicates the transition from P1-P2 to P1-P2-P3 signal. Measurement conditions: nGGM media supplemented

with 0.1% LB and different concentrations of glucose and xylose subsumed in the variable  $x$  with  $0.1 \leq x \leq 1$ . Data in this figure originate from those given in **Figure S3** (corrected for the reference at 0 nM Cd concentration).

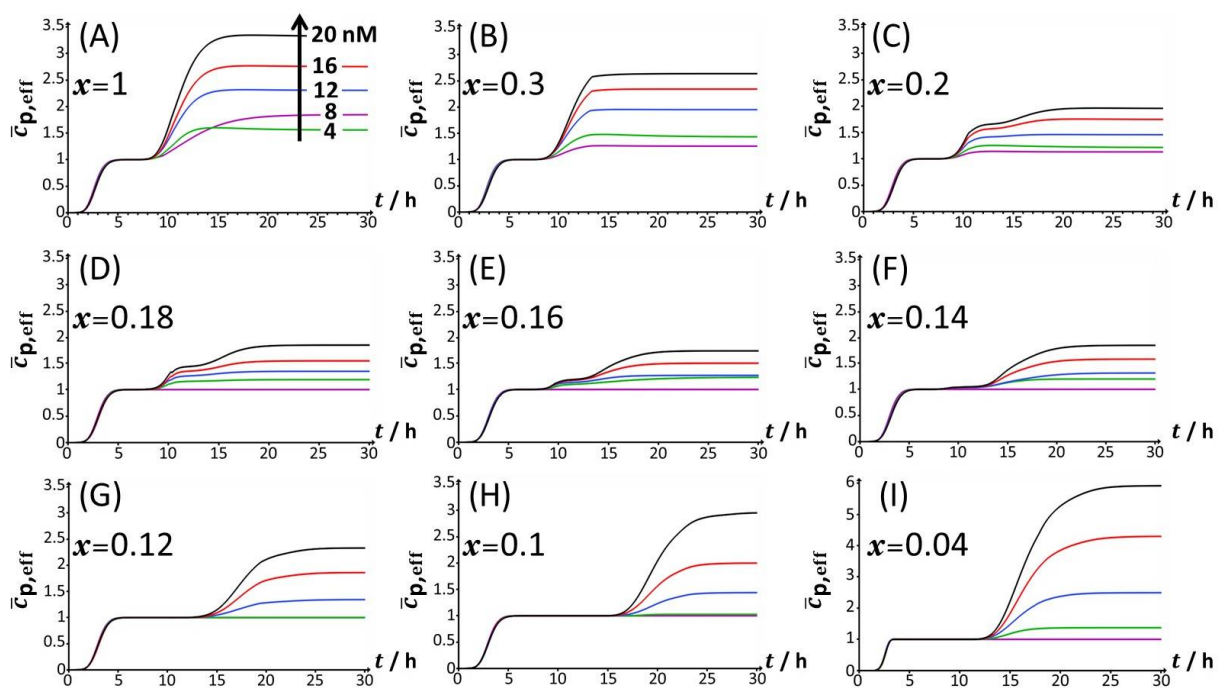


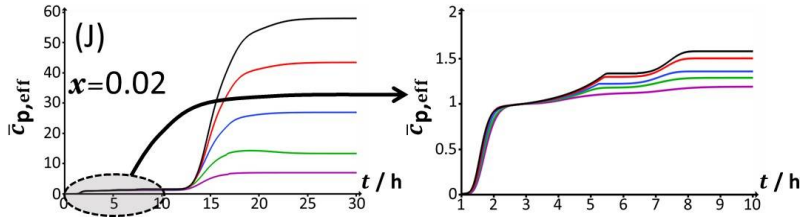
**Figure S5.** Variations of the maxima of the bioluminescence peaks P1 **(A)**, P2 **(B)** and P3 **(C)** with  $x$  and total Cd concentration in solution (indicated). The scale in Cd concentration and associated color nomenclature specified in **(A)** apply to panels **(B)** and **(C)**. Symbols : experimental data. Lines: guides to the eyes. The red-colored zone indicates the transition from P1-P2 to P1-P2-P3 signal. Measurement conditions: nGGM media supplemented with 0.15% LB and different concentration ratios  $x$  in glucose and xylose with  $0.02 \leq x \leq 1$ . Data in this figure originate from those given in **Figure S2** (corrected for the reference at 0 nM Cd concentration).



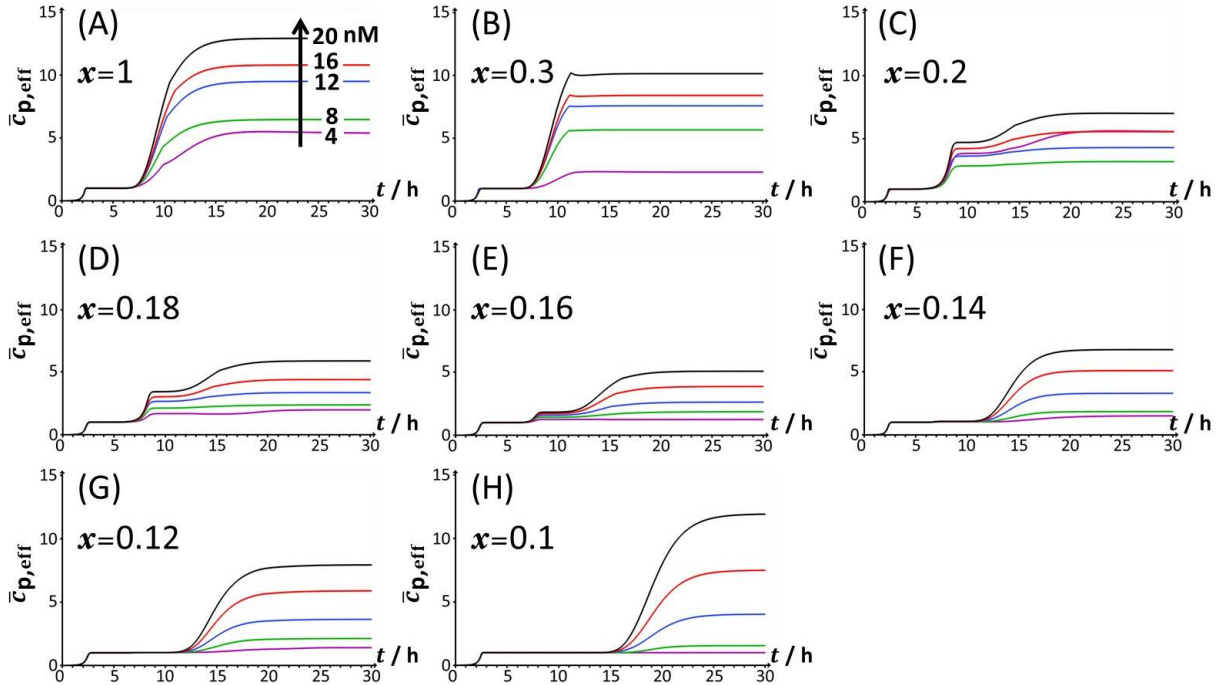


**Figure S6.** Linear dependence of maxima of the bioluminescence peaks P1 (A), P2 (B) and P3 (C) on total Cd concentration in solution (indicated) at selected values of  $x$  (indicated). Symbols : experimental data. Lines: linear regressions. Measurement conditions: nGGM media supplemented with 0.1% LB and different concentration ratios  $x$  in glucose and xylose with  $0.1 \leq x \leq 1$ . Data in this figure originate from those given in **Figure S3** (corrected for the reference at 0 nM Cd concentration).





**Figure S7.** Dependence of the cell photoactivity  $\bar{c}_{p,\text{eff}}$  defined by Eq. (10), on time  $t$  and total Cd concentration (specified) in 0.15% LB for different glucose to xylose concentration ratios corresponding to  $0.02 \leq x \leq 1$  (indicated). The scale in Cd concentration and the associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B) to (J).  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  for given  $x$  and Cd concentration conditions is retrieved from theoretical reconstruction of the corresponding measured time-dependent bioluminescence profile displayed in **Figure S2** following the analysis methodology delineated in §3. The theoretical time-dependent bioluminescence patterns corresponding to the  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  data given in this **Figure S7** are shown in **Figure S2** (solid lines therein). A zoom for the short-time emission of bioluminescence in panel (J) is provided (grey-shaded area).



**Figure S8.** Dependence of the cell photoactivity  $\bar{c}_{p,\text{eff}}$  defined by Eq. (10), on time  $t$  and total Cd concentration (specified) in 0.10% LB for different glucose to xylose concentration ratios corresponding to  $0.1 \leq x \leq 1$  (indicated). The scale in Cd concentration and the associated color nomenclature specified in (A) apply to panels (B) to (H).  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  for given  $x$  and Cd concentration conditions is retrieved from theoretical reconstruction of the corresponding measured time-dependent bioluminescence profile displayed in **Figure S3** following the analysis methodology delineated in §3. The theoretical time-dependent bioluminescence patterns corresponding to the  $\bar{c}_{p,\text{eff}}(t)$  data given in this **Figure S8** are shown in **Figure S3** (solid lines therein).

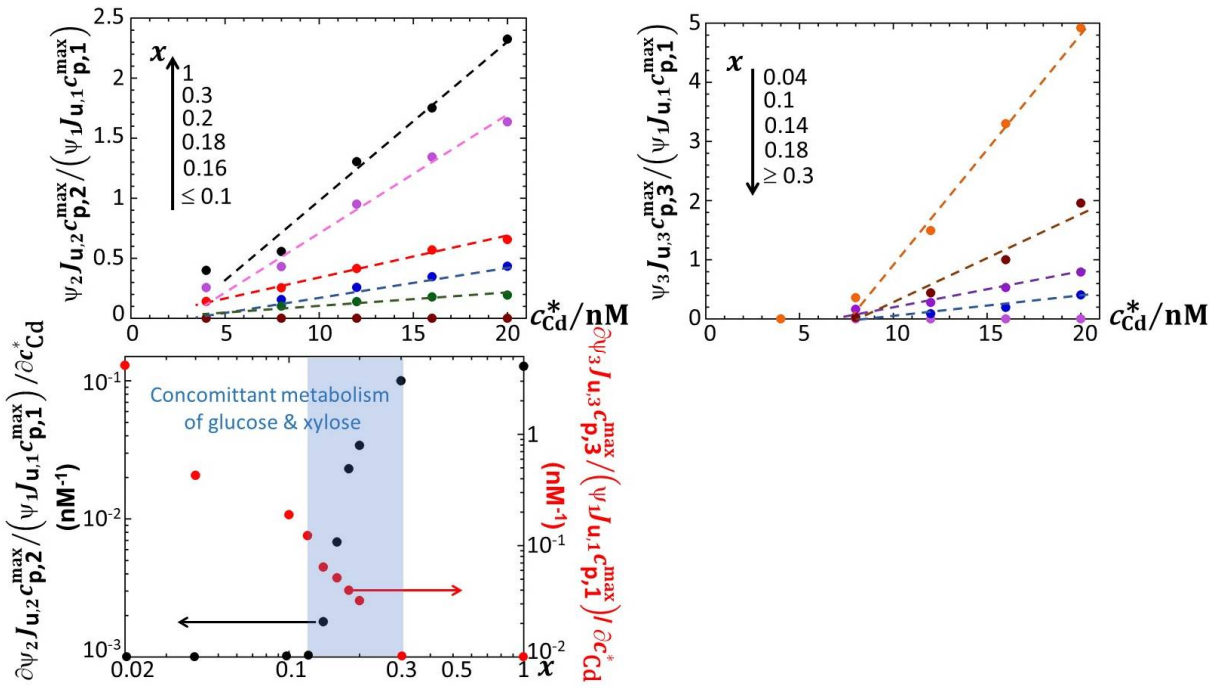


Figure S9. As in Figure 11 of the main text, albeit for 0.15% LB medium.

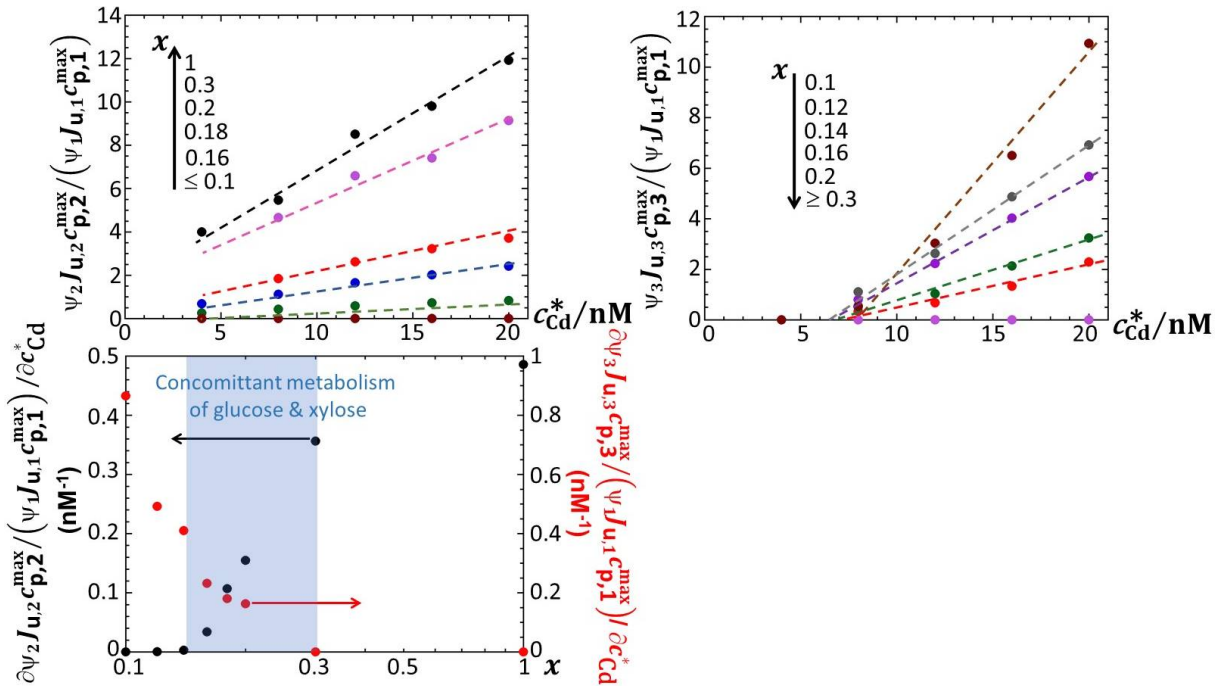


Figure S10. As in Figure 11 of the main text, albeit for 0.10% LB medium.

**Supplementary table (Table S1).**

**Table S1.** Root mean square error (RMSE) values corresponding to the fitting of the normalized bioluminescence signals, collected for Cd-responsive *E. coli* whole-cell biosensor in media supplemented with 0.1% Tryptone, to Eqs. (9)-(10) for the values of total Cd concentration and  $x$  adopted in this work. The measured signals confronted to theory were those corrected by subtraction of 0 nM Cd concentration response and subsequently normalized with respect to the maximum peak amplitude in the first emission mode, as detailed in §3.2 of the main text. The largest RMSE values are obtained at  $x=0.02$  and correspond to the case  $Lum_{max,1} \ll Lum_{max,3}$  with  $Lum_{max,1} \rightarrow 0$  (cf. **Figure 2L** in the main text).

$x$ [Cd] /nM	1	0.5	0.3	0.2	0.18	0.16	0.14	0.12	0.1	0.06	0.04	0.02
4	0.010	0.010	0.009	0.010	0.010	0.011	0.011	0.010	0.008	0.005	0.013	2.75
8	0.008	0.008	0.007	0.023	0.035	0.014	0.024	0.010	0.006	0.006	0.017	0.36
12	0.023	0.015	0.011	0.008	0.012	0.007	0.005	0.006	0.007	0.016	0.029	0.79
16	0.044	0.022	0.018	0.008	0.010	0.009	0.006	0.005	0.009	0.023	0.035	0.66
20	0.020	0.043	0.028	0.014	0.020	0.010	0.008	0.009	0.015	0.036	0.050	0.75

*Chapitre 4. Influence de la qualité  
nutritive du milieu sur la réponse  
temporelle de bioluminescence :  
comparaison des activités  
métaboliques cellulaires de  
biosenseurs spécifiques inductibles au  
Cd et de leurs équivalents non  
spécifiques*

Au cours des dernières décennies, la quantification de substances chimiques et l'évaluation de la toxicité par des biosenseurs bactériens luminescents a reçu un intérêt considérable de la part de la communauté scientifique. C'est notamment en raison de leurs atouts indéniables (faible coût, facilité d'utilisation, sensibilité et spécificité) que leur développement et exploitation constituent une alternative remarquable aux méthodes physico-chimiques conventionnelles. Les biosenseurs luminescents génèrent un signal mesurable (*i.e.* la luminescence) suite à l'activation d'un promoteur qui induit l'expression de gènes rapporteurs *lux* présents naturellement ou introduit par ingénierie génétique. Selon la fonction première du promoteur, il est possible de classer les biosenseurs en trois catégories : les biosenseurs non-spécifiques, semi-spécifiques et spécifiques qui répondent respectivement à un stress général, à un stress donné et à la présence d'un composé cible.

Les biosenseurs non spécifiques impliquent un promoteur exprimé de manière constitutive (*e.g.* *rrnB* P1 chez *Escherichia coli*) fusionné à des gènes *lux*. En présence de substances chimiques induisant des effets nocifs, ces biosenseurs présentent une diminution de la bioluminescence résultante d'une diminution de leur activité métabolique. Les biosenseurs semi-spécifiques impliquent, quant à eux, un promoteur répondant à un stress spécifique (*e.g.* dommage à l'ADN, espèces réactive de l'oxygène (ROS)) fusionné aux gènes *lux*. En présence d'un composé chimique induisant ce stress, ces biosenseurs signalent une augmentation de la bioluminescence à la suite de l'activation du promoteur par une protéine de réponse au stress. Enfin, les biosenseurs dits spécifiques impliquent un promoteur répondant – par l'intermédiaire d'une protéine régulatrice – à la présence intracellulaire d'une espèce chimique donnée. En présence du composé cible, l'expression des gènes *lux*, et par conséquent la luminescence, est induite suite à l'activation d'un promoteur spécifique par la protéine régulatrice.

Bien qu'ayant des applications différentes, les biosenseurs non spécifiques, semi-spécifiques et spécifiques peuvent répondre de manière similaire selon les stress exercés. En présence d'un composé toxique, la bioluminescence émise par un biosenseur spécifique (conçu pour détecter ce composé) peut être réduite en raison des effets nocifs induits par celui-ci. Dans cette situation, les biosenseurs perdent en sensibilité impactant de ce fait leur capacité à détecter le dit-composé. Des effets similaires peuvent être également observés dans d'autres situations, notamment lors de la carence en nutriments (sucres, acides aminés) ou en cofacteurs, ou encore lors d'interactions entre le composé chimique à détecter et les nutriments réduisant de ce fait la biodisponibilité des nutriments et/ou du composé. Afin de contrer ces effets non désirés sur l'expression du gène rapporteur, et donc garantir l'efficacité du biosenseur, plusieurs méthodes ont été développées dans le but de réprimer ces interactions, *e.g.* un biosenseur combinant les propriétés fonctionnelles des trois types de biosenseurs et un biosenseur conçu pour sonder la qualité nutritive du milieu (Baumstark-Khan et al., 2005; Sørensen et al., 2006; Wang et al., 2022).

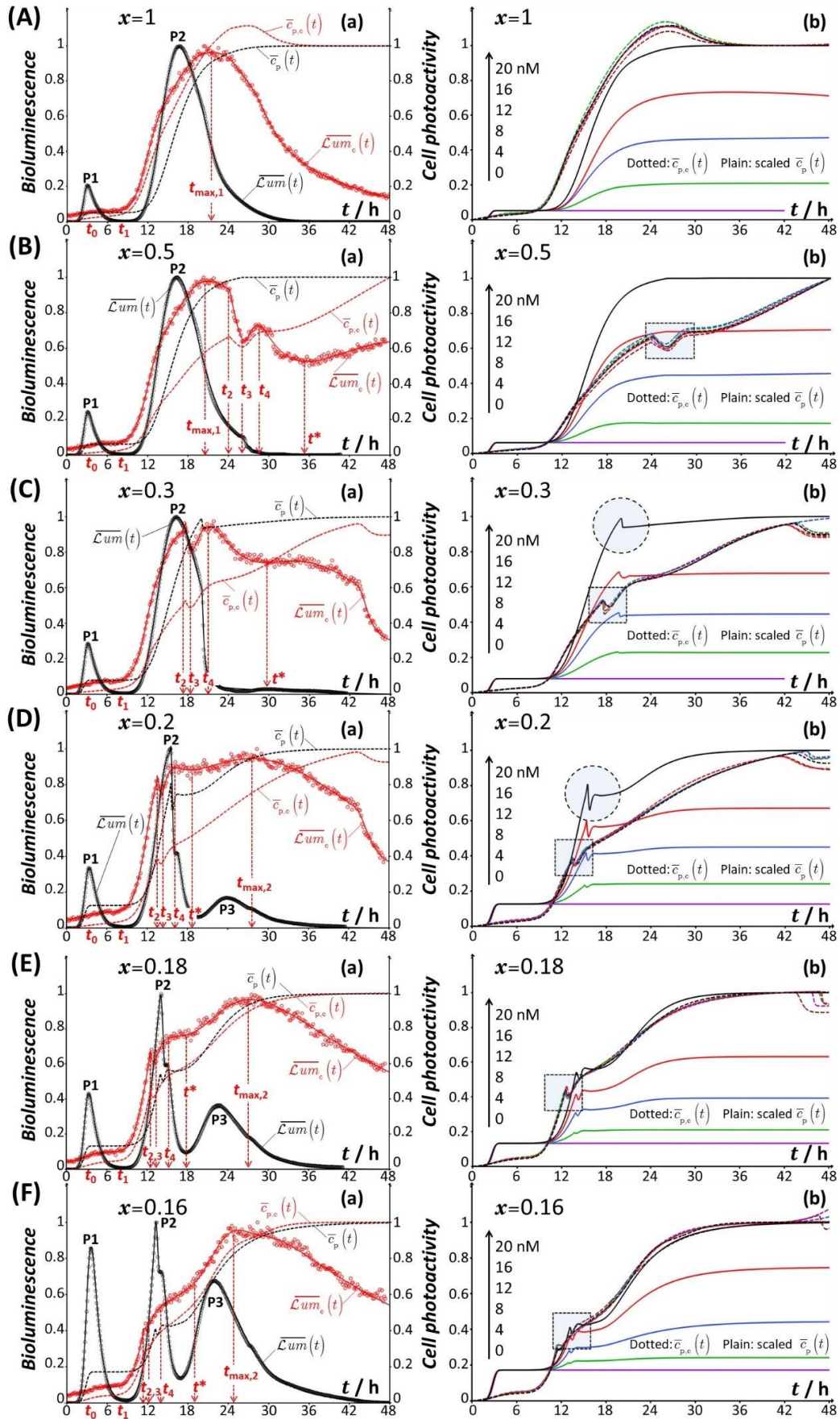
Malgré ces solutions, les connections entre processus intra- et extra-cellulaires qui régissent la réponse temporelle des biosenseurs luminescents (et d'autres) demeurent difficile à quantifier/formaliser d'un point de vue théorique. Dans le cas des biosenseurs spécifiques inductibles aux métaux, il s'agit en particulier de modéliser les processus biophysicochimiques complexes qui définissent la répartition des métaux entre solution et espace intracellulaire et la réponse de bioluminescence correspondante. Ainsi, l'exploitation des signaux restent pour l'essentiel actuellement limitée à des observations corrélatives et empiriques avec le recours à des courbes d'étalonnages et/ou l'estimation de concentrations en métaux en solution à partir de modèle et/ou calcul de spéciation tels que Visual Minteq. Ces approches ignorent les dimensions biologique et dynamique du problème, elles ne tiennent pas compte de la contribution possible des complexes métalliques au flux de bioaccumulation, et elles n'intègrent pas la composante énergétique essentielle à la production de bioluminescence ni la possible déplétion des métaux en solution, tous ces aspects entrant pourtant dans la définition de la réponse temporelle de bioluminescence. De manière similaire, l'évaluation théorique de la toxicité d'un environnement ou d'un analyte à partir du signal temporel de bioluminescence de biosenseurs non spécifiques dépend de la prise en compte de la sensibilité des cellules au stress et de leur capacité à maintenir (ou non) la production de luminescence dans des conditions défavorables.

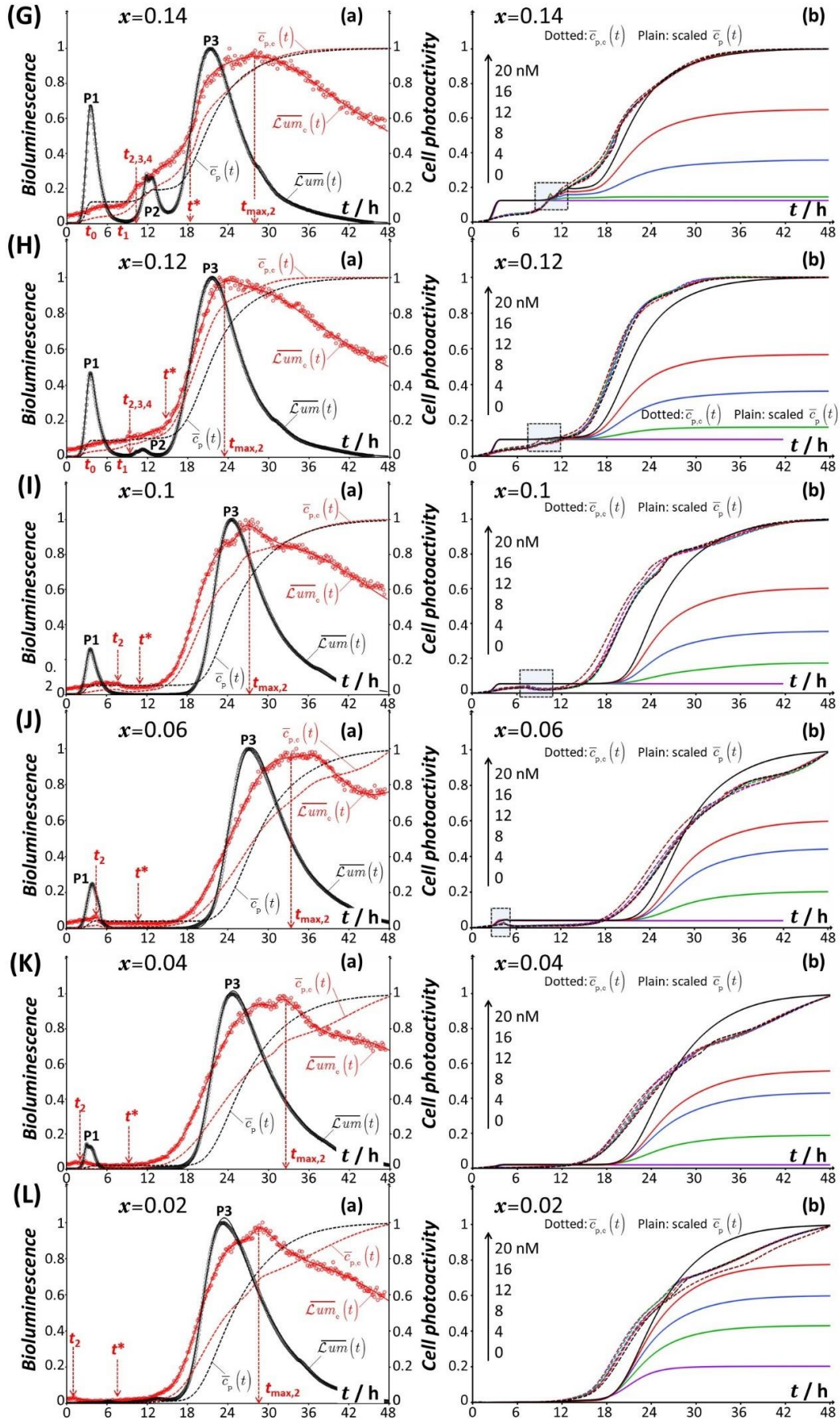
C'est dans ce contexte que **Duval & Pagnout, (2019)** ont établi une formulation de la dépendance temporelle de bioluminescence d'un biosenseur spécifique inductible aux métaux dans des conditions où la concentration cellulaire reste constante au cours du temps et où la concentration en métaux dans le milieu ne varie pas au cours du temps. Le formalisme théorique explique comment la réponse temporelle de bioluminescence est régie par le flux de bioaccumulation, par la cinétique de l'expression des gènes rapporteurs *lux* induite par les métaux, par le taux de production et de dégradation de la luciférase et la cinétique d'émission de photons qui s'ensuit. En outre, il est démontré que la bioluminescence n'est pas proportionnelle à la concentration en cellules photoactives, définie ici comme les cellules métaboliquement actives capables d'émettre de la bioluminescence au cours du temps. La variation de la photoactivité cellulaire au cours du temps reflète la capacité des biosenseurs à réallouer au cours du temps les ressources énergétiques biodisponibles pour maintenir (ou non) le signal de bioluminescence, répondre aux effets toxiques des contaminants ou aux contraintes nutritives du milieu. Le signal peut alors prendre la forme de pics successifs multiples et bien définis dont les caractéristiques (amplitude, nombre, forme, positionnement dans le temps) dépendent non seulement de la concentration en métal mais aussi des voies métaboliques, comme cela a été démontré dans le chapitre précédent pour la réponse temporelle des biosenseurs spécifiques *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd.

Les résultats présentés dans ce chapitre font suite à ceux du précédent chapitre qui ont été publiés dans (**Delatour et al., 2022**) et où sont détaillés les liens complexes multifactoriels entre conditions

nutritionnelles du milieu et typologie de la réponse temporelle des biosenseurs spécifiques *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd. Ici, nous présentons une analyse détaillée soulignant les différences et les similitudes entre réponses temporelles de bioluminescence des biosenseurs spécifiques *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd et des biosenseurs non spécifiques *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* impliquant le promoteur *rrnB* P1 qui contrôle l'expression de l'un des sept opérons de l'ARNr chez *E. coli*. L'analyse, comme dans le **chapitre 3**, est effectuée en variant systématiquement la composition des milieux via le contrôle de la source et de la concentration de carbone (glucose, xylose et en mélange). Les différences des signaux temporels entre les deux types de biosenseurs concernent leur forme générale, le nombre de pics clairement identifiables, le positionnement des discontinuités (troncatures) des pics observés dans le temps et l'intensité des réponses cellulaires mesurées. Bien que ces deux biosenseurs aient un fonctionnement et un mécanisme d'activation de leurs promoteurs clairement différents, ce qui se traduit par leur typologie respective de réponse, nous démontrons que leurs photoactivités cellulaires respectives présentent quant à elle des similitudes. En particulier, les signaux de bioluminescence présentant 1 ou 2 pics produits par les biosenseurs spécifiques et non spécifiques dans des conditions contrôlées par la réponse stringente, correspondent tous deux à 2 augmentations sigmoïdales successives de leur photoactivité cellulaire. De manière similaire, les discontinuités de photoactivité cellulaire engendrées au cours du temps par les répressions cataboliques sont observées à la fois pour les biosenseurs spécifiques et les biosenseurs non spécifiques (**Fig. 1**)







**Fig. 1 :** (a) Comparaison entre la réponse temporelle du signal de bioluminescence de la souche *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE Lum<sub>c</sub>(t)* (ligne pleine rouge) et la souche *Escherichia coli zntA-luxCDABE Lum(t)*, (ligne pleine noire) avec la correspondance de la concentration en cellules photoactives  $\bar{c}_{p,c}(t)$  (souche non spécifique) et  $\bar{c}_p(t)$  (souche spécifique) (lignes en pointillés rouge et noire, respectivement) à  $c_{Cd}^* = 20$  nM et pour différentes valeurs de  $x$  ( $0.02 \leq x \leq 1$ , indiqué) avec  $x = \frac{[Glu]}{[Glu]+[Xyl]}$ . (b) Comparaison entre photoactivités cellulaires  $\bar{c}_{p,c}(t)$  (lignes en pointillées) et  $\bar{c}_p(t)$  (lignes pleines) estimées à partir de l'analyse théorique de la réponse de bioluminescence d'*E. coli rrnB P1-luxCDABE* et *E. coli zntA-luxCDABE*, respectivement, pour les différentes concentrations totales en Cd testées (indiquées par la flèche) pour différentes valeurs de  $x$ . Les panneaux (A-L) font référence aux différentes valeurs de  $x$  testées. P1, P2, et P3 correspondent aux pics de bioluminescence émis par le biosenseur *E. coli zntA-luxCDABE*. Les points temporels  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{max,1}$  et/ou  $t_{max,2}$  précisés pour chaque condition  $x$  servent à détailler la réponse en fonction du temps du biosenseur *E. coli rrnB P1-luxCDABE*. Les cercles et carrés en pointillés apparaissant dans certains des panneaux mettent en évidence les points communs de  $\bar{c}_p(t)$  et  $\bar{c}_{p,c}(t)$  respectivement.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont été publiés en 2022 dans la revue *Biosensors*.

Comparative analysis of cell metabolic activity sensing by *Escherichia coli rrnB P1-lux* and Cd responsive-*lux* biosensors: time-resolved experiments and mechanistic modelling. Delatour, E.; Pagnout, C.; Zaffino, M. and Duval, J.F.L. *Biosensors* **2022**, 12, 763 (DOI :10.3390/bios12090763).

### *Références bibliographiques :*

- Baumstark-Khan, C., Cioara, K., Rettberg, P., & Horneck, G. (2005). Determination of geno- and cytotoxicity of groundwater and sediments using the recombinant SWITCH Test. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40(2), 245-263.
- Delatour, E., Pagnout, C., Zaffino, M., & Duval, J. F. L. (2022). Exploiting catabolite repression and stringent response to control delay and multimodality of bioluminescence signal by metal whole-cell biosensors : interplay between Metal Bioavailability and Nutritional Medium Conditions. *Biosensors*, 12(5), 327.
- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2019). Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting whole-cell bacterial sensors. *ACS Sensors*, 4(5), 1373-1383.
- Sørensen, S. J., Burmølle, M., & Hansen, L. H. (2006). Making bio-sense of toxicity: New developments in whole-cell biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1), 11-16.
- Wang, Y.-Z., Christopher, J. K., Yong, Y.-C., & Zhai, D.-D. (2022). Nutrient detection with whole-cell biosensors. In G. Thouand (Éd.), *Handbook of Cell Biosensors* (p. 747-766).

## Article

# Comparative Analysis of Cell Metabolic Activity Sensing by *Escherichia coli* *rrnB* P1-*lux* and Cd Responsive-*Lux* Biosensors: Time-Resolved Experiments and Mechanistic Modelling

Eva Delatour<sup>1</sup>, Christophe Pagnout<sup>1</sup>, Marie L. Zaffino<sup>1</sup> and Jérôme F. L. Duval<sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR7360, Campus Bridoux, F-57070 Metz, France

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, UMR7360, F-54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\* Correspondence: jerome.duval@univ-lorraine.fr

**Abstract:** Whole-cell bacterial sensors are used in medical/environmental applications to detect chemicals, and to assess medium toxicity or stress. Non-specific constitutive biosensors generally serve the latter purpose, whereas chemical detection is performed with biosensors involving a specific chemical-inducible promoter. Herein, we show that functioning principles of specific and non-specific whole-cell biosensors are not exclusive as both can probe modulations of cell metabolic activity under stressing conditions. The demonstration is based on (i) *time-resolved* measurements of bioluminescence produced by constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* *Escherichia coli* biosensor in media differing with respect to carbon source, (ii) theoretical reconstruction of the measured signals using a here-reported theory for bioluminescence generated by constitutive cells, (iii) comparison between time-dependent cell photoactivity (reflecting metabolic activity) retrieved by theory with that we reported recently for cadmium-inducible *PzntA-luxCDABE* *E. coli* in media of similar compositions. Whereas signals of constitutive and non-constitutive biosensors differ in terms of shape, amplitude and peak number depending on nutritional medium conditions, analysis highlights the features shared by their respective cell photoactivity patterns mediated by the interplay between stringent response and catabolite repressions. The work advocates for the benefits of a *theoretical interpretation for the time-dependent response of biosensors* to unravel metabolic and physicochemical contributions to the bioluminescence signal.

**Keywords:** bioluminescence; whole-cell biosensors; metals; bioavailability; medium nutritional quality; signal dependence on time



**Citation:** Delatour, E.; Pagnout, C.; Zaffino, M.L.; Duval, J.F.L. Comparative Analysis of Cell Metabolic Activity Sensing by *Escherichia coli* *rrnB* P1-*lux* and Cd Responsive-*Lux* Biosensors: Time-Resolved Experiments and Mechanistic Modelling. *Biosensors* **2022**, *12*, 763. <https://doi.org/10.3390/bios12090763>

Received: 18 August 2022

Accepted: 11 September 2022

Published: 16 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Whole-cell bacterial sensors are now well-established tools among the arsenal of instruments used by the scientific community for detecting and quantifying chemicals (e.g., drugs [1,2], toxins [3], quorum sensing signaling molecules [4], siderophores [5]), pollutants (e.g., metals [6], organics [7]) or microbial pathogens [8] in biological media [9] or environmental samples [10,11], and for addressing the toxicity of contaminants [12]. They offer an elegant alternative to conventional physicochemical methods (e.g., extraction, chromatography) due to their cost, ease of use, specificity and sensitivity [13]. Bacterial sensors generate a measurable signal (e.g., luminescence, fluorescence) following the expression of a reporter gene (e.g., *lux* and *gfp*, respectively) either naturally present in the bacterial strain or introduced by genetic engineering downstream of a promoter [13]. Depending on the manner in which this promoter is activated, whole-cell bacterial sensors can be classified into three distinct categories [12]: non-specific (or general) toxicity biosensors, such as the historical and commercially available Microtox<sup>®</sup> [14,15], semi-specific biosensors responding to a given stress [12,13,16–18], and specific biosensors whose output signal is

triggered by a given chemical compound that actuates a tightly regulated promoter fused upstream of the reporter gene [6,13,18,19].

Taking the example of luminescence (*lux*)-based whole-cell biosensors of interest in this work, non-specific toxicity biosensors involve a promoter that is constitutively expressed under normal conditions and fused to a *lux* operon [20]. These biosensors report a decrease in bioluminescence as a result of a reduction in or suppression of the promoter's transcription following a decrease in cell metabolic activity induced by harmful effects caused by a toxicant or a mixture of toxicants [21]. Illustrative examples of such promoters are *rrnB* P1 that controls the expression of one of the seven rRNA operons in *E. coli* [22,23] or the promoters *Pcpc* or *PpsbA* that control the expression of the main components of the photosynthetic apparatus in cyanobacteria [24]. Semi-specific luminescent biosensors produce a signal in response to harmful chemicals and/or to stressing medium conditions upon activation of defence mechanism(s) against the produced stress. Here, the biosensor signal is induced by the expression of a *lux* operon triggered by a promoter that is activated by the stress, e.g., damage of DNA, proteins or membrane, or production of reactive oxygen species (ROS) [12,17,25,26]. Lastly, the functioning of specific whole-cell *lux*-based biosensors relies on the activity of a promoter that is stimulated by a given target chemical whose intracellular sensing is ensured by a regulatory protein and by the subsequent promoter expression. Historical examples of specific promoter-*lux* assemblies include *tbuA1p-luxAB*, *arsRp-luxAB*, *merTp-luxCDABE*, *zntAp-luxCDABE* or *alkAp-luxCDABE* for the detection of benzene, arsenite, mercury, cadmium, and DNA-alkylating agents, respectively, to quote only a few [13].

The working principles of non-specific, semi-specific (stress-responsive) and specific (chemical-responsive) whole-cell biosensors are not exclusive in practice. Indeed, the possible stress induced by a chemical to be detected by a biosensor specifically designed for that purpose, may lead to a decrease in or even suppression of the cell signal. In turn, this reduces detection sensitivity and diminishes the capability of the biosensor to probe quantitatively the occurrence of chemicals in a solution. Similar effects may be produced without invoking chemical-induced stress, e.g., deficiencies of nutrients in the extracellular medium, a lack of cofactors required to sustain cell activity and metabolism, a poor quality of the supplied food, or even interactions of nutrients with targeted chemical with a resulting decrease in food and/or chemical bioavailability. These undesired but sometimes unavoidable processes can severely inhibit the expression of the reporter gene and impact on the sensing function of the biosensor. Methodologies to circumvent these undesired cross-reactivities affecting specificity and/or sensitivity of whole-cell biosensors, exist. They consist (i) in the use of bioreporters combining functional properties of non-specific, semi-specific and/or specific biosensors with the possible accommodation of several reporter genes in a single sensing cell [12,27], (ii) in the reading of a signal output delivered separately by whole-cell biosensors that differ with respect to their specificity level [23], (iii) in the recourse to biosensors designed for nutrient analysis [28], or (iv) in the construction of microfluidic device for parallel single-analyte or simultaneous multi-analyte detections by coupling multiplex biosensors [7,10].

This ensemble of experimental designs actually palliates the difficulty to address theoretically the multiple extracellular and intracellular factors that control the time-dependent response of whole-cell biosensors and their overall performance. For the sake of illustration, quantifying the concentration of (bioavailable) metals from the signal of a metal-responsive (non-constitutive) luminescent biosensor still remains today a formidable challenge. This is explained by the complexity of the intertwined processes that define, e.g., the partitioning of the relevant metal forms at the biosensor/solution interface [29–38] and the ensuing time-dependent bioluminescence [39,40]. In turn, the analysis remains currently limited to correlative observations that often involve the recourse to calibration media whose nutritional quality is tacitly supposed equivalent to that of the sample of interest. Common strategy further relies on empirical connections between bioluminescence cell output and bulk metal concentrations estimated from equilibrium Biotic Ligand Model (BLM)

and, e.g., Visual MINTEQ metal speciation code [13,29,41–46]. As extensively commented elsewhere [29–40], the BLM-based approach suffers from a number of approximations, e.g., it ignores a priori the possible contribution of labile metal complexes to the flux of bioaccumulated metals [30,32,36–38], it misses any rationale of the energetic cell demands required to convert internalized metals into cell signal output [23,39,40], it fails to reproduce metal bioaccumulation kinetics captured by Best's formalism and extensions thereof [30,31,33,34], and it discards the implications of bulk metal depletion [31,33,34,47] or passive metal adsorption [48] on metal bioavailability and biosensor signal. Similarly, theoretical evaluation of medium toxicity from analysis of non-specific biosensors signal is tied to a successful formulation of cell sensitivity to stress and of the resulting cell ability to maintain (or not) light production under unfavourable conditions. As a result, the analysis of the response of constitutive and non-constitutive biosensors is generally restricted to mere consideration of the only maximal cell signal amplitude [41–46] without comprehensive evaluation of the information-rich dependence of the signal on time [40]. The feasibility of current biosensing practice and reliability of corresponding results thus basically rests on the availability of proper controls as any decrease in the overall metabolic activity of a given stress-responsive or chemical-responsive biosensor may produce similar effects to those in the absence of the targeted stress or chemical, which possibly leads to false negative or false positive [12]. Outcomes are therefore often semi-qualitative at best. Clearly, further mechanistic and quantitative information on the biotic and abiotic factors governing bioluminescence emission by whole-cell biosensors is still critically needed.

In their attempt to rationalize and increase predictability of whole-cell biosensors signal, Duval et al. derived a formalism for the time-dependent bioluminescence response of metal-detecting *lux*-based *Escherichia coli* biosensors under conditions where cell concentration remains constant over time and metal depletion from bulk solution is not operational [39]. Theoretical results were successfully confronted against measurements of bioluminescence produced by *E. coli* sensors engineered with pZnt-*lux* plasmid harbouring a Cd-inducible *zntA-luxCDABE* gene fusion [23,39,40]. The formalism explains how the dependence of bioluminescence on time is governed by rapidly established steady-state metal biouptake flux, by the metal-mediated kinetics of *lux*-reporter expression, by the ensuing rates of luciferase production/degradation, and the kinetics of photon emission. A remarkable result is that, contrary to modelling reports in the literature [49], bioluminescence is *not* proportional to the concentration of photoactive cells in solution or, equivalently, it is not related linearly to cell photoactivity. Changes in the latter with time reflect the way cells (re)allocate bioavailable energetic resources to sustain light production, cope with or adapt to toxicity/hormesis effects mediated by contaminants or to limitations in essential nutrients [23,39,40,48]. In line with this theory, the cell signal may then take the form of multiple, well-defined successive peaks whose defining patterns (amplitude, number, shape, time-positioning) are not only dependent on metal concentration but also on the kinetic settings of the metabolic pathways over the course of time [23,40].

As a follow-up of these results, we provide here a comprehensive and parsimonious theory for modelling the full time-dependence of bioluminescence signal generated by non-specific constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* *Escherichia coli* biosensor. The structure of the obtained theoretical expression is validated by the confrontation to time-resolved bioluminescence measurements in aqueous media with variable contents of carbon in the form of glucose and/or xylose. Fundamentals of the theory are further supported by comparison with results we recently reported for Cd-inducible *luxCDABE*-based *E. coli* under similar cell incubation conditions [40]. Despite the differentiated shapes of the constitutive and non-constitutive cell responses with time, the analysis evidences the common features shared by their time-dependent cell photoactivities estimated from proper deconvolution of the signals. Remarkably, we show how the responses of both biosensors, despite their different modes of promoter activation, reflect the same processes that govern the metabolism of amino acids and carbon required to sustain light production. Differences between constitutive and non-constitutive cell signal patterns originate from the here-formulated impacts

of whole-cell biosensor conditioning prior to bioluminescence measurement, and from the extent of the long-term signal extinction caused by the inhibition of luciferase production and activity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Luminescent Whole-Cell Bacterial Reporters

The non-specific whole-cell bacterial sensor adopted in this work was constructed from *Escherichia coli* BW25113 strain obtained from the Coli Genetic Stock Center at Yale University [50]. Construction was realized by transforming BW25113 strain with the plasmid pET28 *rrnB* P1-*luxCDABE* [51] where the expression of *luxCDABE* operon is controlled by the ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter. This plasmid was kindly provided by Kulbachinskiy A. and Esyunina D. from the Institute of Molecular Genetics, Moscow. Time-resolved bioluminescence data collected on *rrnB* P1-*luxCDABE* BW25113 sensor were systematically compared with those we reported elsewhere [40] for the Cd-responsive pZntA-*luxCDABE* BW25113 whole-cell biosensor under similar incubation conditions (specified in §2.2). The latter specific Cd-responsive biosensor was constructed with the plasmid pUCD615 pZntA-*luxCDABE*. To ensure the relevance of the comparison, bioluminescence responses of the non-specific constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* biosensor were measured in media containing Cd ions in the concentration range 0–20 nM which excludes Cd-mediated toxicity effects [23,40,48].

### 2.2. Cell Growth Condition, and Nutritive Medium Composition in Bioluminescence Assays

The procedure adopted here to prepare the suspensions of biosensors is similar to that detailed in [40] except for a few modifications. In detail, the cryo-preserved (−80 °C) constitutive bacterial cells were inoculated on LB-agar agar supplemented with 30 µg/mL of kanamycin and incubated at 37 °C for 24 h. Isolated colony was transferred to a 125 mL erlenmeyer flask containing 20 mL of LB medium (10 g/L casein peptone, 5 g/L yeast extract and 10 g/L NaCl, Fisher Scientific™) supplemented with 60 µL kanamycin 10 mg/mL. Samples were then incubated at 37 °C for 9 h under agitation at 160 rpm. Pre-cultured cells were used to inoculate (at 1:100 dilution) 100 mL of LB medium with 300 µL of kanamycin 10 mg/mL, after which cells were incubated overnight at 37 °C under agitation at 160 rpm. The OD<sub>600nm</sub> of the thus-prepared bacterial suspensions was measured, and samples were then subdivided into 16 aliquots of 5 mL. These 16 aliquots were washed twice by centrifugation (7000× *g*, 3 min) with nGGM medium (MOPS 40 mM (Acros organics), MgCl<sub>2</sub> 1 mM (Sigma-Aldrich), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 12.5 mM (Merck), 10 mM KNO<sub>3</sub> (Normapur®), 5 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Normapur®), 0.068 mM CaCl<sub>2</sub> (Prolabo), 5 mM β-glycerophosphate (Sigma), pH 6.8 adjusted by addition of 0.1 M NaOH) supplemented with tryptone (1% *v/v*) as amino acids source (Euromedex), and glucose and xylose (Sigma-Aldrich) at different concentration ratios (100/0, 50/50, 30/70, 20/80, 18/82, 16/84, 14/86, 12/88, 10/90, 6/94, 4/96, 2/98). In the following section, we denote  $x$  as the ratio between glucose concentration and sum of glucose and xylose concentrations, the explored conditions thus corresponding to  $x = 1, 0.5, 0.3, 0.2, 0.18, 0.16, 0.14, 0.12, 0.1, 0.06, 0.04$ , and 0.02. Cell suspensions were resuspended in these media to obtain a final optical density of 2.0 at 600 nm. The 100% glucose and 100% xylose reference conditions correspond to 0.5% (*m/v*) glucose and 0.5% (*m/v*) xylose concentrations in the medium, respectively.

### 2.3. Bioluminescence Measurements

Similarly to [40], bioluminescence measurements were performed in a 96-well microplate (Nunc™, Thermo Scientific™, Illkirch, France) with a SAFAS Xenius luminometer (SAFAS, Monaco). Wells were filled with 70 µL of milli-Q ultrapure water, 10 µL of nGGM medium, 10 µL of bacterial culture prepared according to §2.2, and 10 µL of Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Fluka) to obtain a final total concentration range of Cd(II) from 0 to 20 nM. This range corresponds to a linear response of the non-constitutive Cd-responsive cells with total Cd concentration, and to the absence of metal-induced toxicity effects [40,48].



In turn, tryptone concentration adopted for the bioluminescence assays was 0.1% (*v/v*), and that of the nGGM-glucose/xylose medium corresponded to a 5-fold dilution of the nGGM glucose/xylose solution prepared as detailed in §2.2. Luminescence was measured at 490 nm every 5 min for 48 h at 25 °C, with each measurement preceded by orbital shaking for 10 sec (3 mm amplitude at 10 Hz frequency). We further verified that the optical density at 600 nm remains constant at a value of 0.2 over the entire duration of the luminescence assays, thereby ensuring that the *total* cell concentration is independent of time. Below, we identify the mathematical similarities between here-elaborated time-dependent bioluminescence expression for constitutive biosensors and the one reported in [39,40] for their metal-responsive analogues.

### 3. Theory

#### 3.1. Kinetics of Bioluminescence Emission by Non-Specific Lux-Biosensors Involving a Constitutive Promoter

In the following developments, we consider an aqueous medium of volume  $V_T$  containing *lux*-based bacterial sensors producing bioluminescence constitutively. We denote as  $N_c(t)$  the number of photoactive cells at time  $t$ , and the corresponding concentration of photoactive bacteria is defined by  $c_{p,c}(t) = N_c(t)/V_T$  ( $\text{m}^{-3}$ ), where the subscript  $c$  stands for ‘constitutive’. The overall concentration of luciferase produced in the entire volume  $V_T$  at  $t$  is given by  $S_a\phi_{Lu,c}(t)c_{p,c}(t)$  (in  $\text{mol m}^{-3}$ ) where  $\phi_{Lu,c}(t)$  (in  $\text{mol m}^{-2}$ ) is the intracellular concentration of luciferase at  $t$  expressed per unit cell surface, and  $S_a$  is the cell surface area ( $\text{m}^2$ ). Accordingly, the rate of luciferase production per unit solution volume is written  $S_a d[\phi_{Lu,c}(t)c_{p,c}(t)]/dt$  (in  $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ) where  $S_a$  is set independent of time. At any  $t$ , this quantity must satisfy the mass balance condition which we write in the simple form

$$S_a d[\phi_{Lu,c}(t)c_{p,c}(t)]/dt = k_{f,c}c_{p,c}(t)/K_{Hi,c} - k_{r,c}S_a\phi_{Lu,c}(t)c_{p,c}(t) + k_{fo,c} \tag{1}$$

Following Hill’s framework for the practical formulation of protein production rates [39,52–54],  $K_{Hi,c}$  (in  $\text{m}^{-3}$ ) in Equation (1) serves as an indicator for the number concentration of regulating RNA polymerase (per cell volume) required to initiate gene transcription, and  $k_{f,c}$  (in  $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ) stands for the kinetic constant of luciferase production (or formation, subscript ‘ $f$ ’) whose rate at  $t$  is set proportional to the corresponding concentration  $c_{p,c}(t)$  of radiating cells present in solution [55]. In turn, the quantity  $k_{f,c}/K_{Hi,c}$  can be viewed as a measure of the strength of the promoter. The term  $k_{r,c}S_a\phi_{Lu,c}(t)c_{p,c}(t)$  in Equation (1) corresponds to the effective rate of luciferase ‘removal’, which encompasses all processes leading to a reduction in the flux of emitted photons, e.g., luciferase activity inhibition [39], with an associated kinetic constant denoted as  $k_{r,c}$  (in  $\text{s}^{-1}$ ). Finally,  $k_{fo,c}$  is the kinetic constant (in  $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ) featuring any possible basal production of luciferase, independent of cell concentration in solution [52]. As demonstrated in [39], the bioluminescence produced at  $t$ , denoted as  $\mathcal{L}um_c(t)$  (in  $\text{counts s}^{-1}$ ), is further given by the following integral equation

$$\mathcal{L}um_c(t) = k_v S_a V_T \int_0^t q(t, \tau) \frac{d[\phi_{Lu,c}(\tau)c_{p,c}(\tau)]}{d\tau} d\tau \tag{2}$$

where  $k_v$  ( $\text{counts mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) is the kinetic constant for photons production per mole of luciferase and  $q(t, \tau)$  is a dimensionless function that quantifies how much bioluminescence at time  $t$  has decreased for bacterial cells activated at an earlier time  $\tau (< t)$  [55], this idea being in line with the well-documented decay kinetics of photons emission by bacterial luciferase [56]. The (dimensionless) factor  $q(t, \tau)$  can be interpreted in different ways, all leading to the mathematical formulation of bioluminescence according to Equation (2) [55]. It reflects either a decrease in the number of photoactive cells in solution (i.e., a fraction of cells is inactive (no emission), whereas another produces light at constant emission rate), a decrease in the emission rate of all individual cells (all producing light with a given

decay kinetics), or a combination of these two effects. The key idea remains the mandatory discrimination between time-dependent concentration of photoactive cells and total cell concentration [39,55], the latter being constant over time under the experimental conditions of interest in this work (cf. §2). Retaining the first aforementioned definition for  $c_{p,c}(t)$ , the fraction of photoactive cells at time  $t$  is necessarily connected to the concentration of produced luciferase as governed by the differential Equation (1). For the sake of simplicity, we consider that luciferase generated at time  $\tau$  emit photons at constant rate  $k_v$  for a duration of  $\tau_q$  (s) referred to as ‘quenching time’ in [55]. This representation comes to assimilate the function  $q(t, \tau)$  to a gate function with unit value for  $\tau \leq t \leq \tau + \tau_q$  and with 0 value outside this time interval [39]. Equation (2) then becomes [39]

$$\mathcal{Lum}_c(t) = k_v S_a V_T \{ \phi_{Lu,c}(t) c_{p,c}(t) - H(t, \tau_q) \phi_{Lu,c}(t - \tau_q) c_{p,c}(t - \tau_q) \} \tag{3}$$

where  $H(t, \tau_q)$  is the Heaviside function defined by  $H(t, \tau_q) = 0$  for  $t \leq \tau_q$  and  $H(t, \tau_q) = 1$  for  $t > \tau_q$ . Realizing that the emission decay kinetics for luciferase molecule is much faster than the measurement timescale, i.e.,  $t \gg \tau_q$  (with  $t \in [0-48 \text{ h}]$  in this work, and  $\tau_q \sim 1 \text{ min}$  at most [55,56]), Equation (3) simplifies into

$$\mathcal{Lum}_c(t) = k_v \tau_q S_a V_T d[\phi_{Lu,c}(t) c_{p,c}(t)] / dt \tag{4}$$

Solving Equation (1) and substituting the solution into Equation (4), we obtain after some algebra

$$\mathcal{Lum}_c(t) = k_v V_T K_{Hi,c}^{-1} k_{f,c} \tau_q c_{p,c}^{\max} \left[ \bar{c}_{p,c}(t) + \beta e^{-k_{r,c}t} - k_{r,c} \chi_c(t) \otimes \bar{c}_{p,c}(t) \right] \tag{5}$$

where we have introduced the dimensionless concentration of photoactive cells at  $t$ ,  $\bar{c}_{p,c}(t)$ , hereafter termed cell photoactivity and defined by  $\bar{c}_{p,c}(t) = c_{p,c}(t) / c_{p,c}^{\max}$ , with  $c_{p,c}^{\max}$  the maximum number concentration (in  $\text{m}^{-3}$ ) of light-producing cells the medium can sustain over the whole time-window of the bioluminescence measurements. Stated differently,  $c_{p,c}^{\max}$  refers to the medium carrying capacity which obviously depends on the quality and amount of nutriment in the solution. To facilitate comparison with the results reported in [40] for metal Cd-responsive whole-cell biosensors, we adopt the convention  $\bar{c}_{p,c}(t = 0) = 0$ . The symbol  $\otimes$  in Equation (5) defines the convolution product operator in the time domain, i.e.,  $x(t) \otimes y(t) = \int_0^t x(t - \xi) y(\xi) d\xi$  where  $x(t)$  and  $y(t)$  are dummy functions of time. The time-dependent function  $\chi_c$  in Equation (5) is given by  $\chi_c(t) = e^{-k_{r,c}t}$ , and the dimensionless constant  $\beta$  in Equation (5) is further provided by

$$\beta = k_{fo,c} K_{Hi,c} / \left( k_{f,c} c_{p,c}^{\max} \right) \tag{6}$$

We easily infer from Equations (5) and (6) that bioluminescence at  $t = 0$  relates to  $k_{fo,c}$  via

$$\mathcal{Lum}_c(t = 0) = k_v V_T K_{Hi,c}^{-1} k_{f,c} \tau_q c_{p,c}^{\max} \beta = k_v V_T \tau_q k_{fo,c} \tag{7}$$

Equations (5) and (6) are important results of this paper as they explicitly detail how bioluminescence of constitutive whole-cell biosensors evolves with time depending on cell photoactivity profile ( $\bar{c}_{p,c}(t)$ ), promoter strength and rate of luciferase production ( $k_{f,c}, k_{fo,c}, K_{Hi,c}$ ), luciferase inhibition kinetics ( $k_{r,c}$ ), characteristic timescale of luciferase emission ( $\tau_q$ ), and medium carrying capacity ( $c_{p,c}^{\max}$ ).

On the basis of Equation (5), explicit analytical expressions of  $\mathcal{Lum}_c(t)$  can be derived in the scenario corresponding to  $\tilde{t} < t \ll \tilde{t} + 1/k_{r,c}$  where  $\tilde{t}$  is the timepoint beyond which medium carrying capacity is reached, i.e.,  $\bar{c}_{p,c}(t > \tilde{t}) \sim 1$ . Under such conditions, we show that  $\mathcal{Lum}_c(t)$  decreases linearly with  $t$  according to

$$\mathcal{Lum}_c(t) \approx k_v V_T K_{Hi,c}^{-1} k_{f,c} \tau_q c_{p,c}^{\max} \gamma [1 - k_{r,c}(t - \tilde{t})] \tag{8}$$

which is obtained after Taylor expansion of Equation (5) up to first order in the (dimensionless) quantity  $k_{r,c}(t - \tilde{t})$ . The dimensionless and time-independent constant  $\gamma$  involved in Equation (8) satisfies

$$\gamma = 1 + e^{-k_{r,c}\tilde{t}} \left( \beta - k_{r,c} \int_0^{\tilde{t}} \bar{c}_{p,c}(t) e^{k_{r,c}t} dt \right) \tag{9}$$

Another limiting expression of practical interest for  $\mathcal{Lum}_c(t)$  can be found for observation timescales  $t$  where processes leading to luciferase inhibition are not significantly operative, i.e.,  $k_{r,c}t \ll 1$ . In this time domain, the result then reads as

$$\mathcal{Lum}_c(t) \approx k_v V_T K_{Hi,c}^{-1} k_{f,c} \tau_q c_{p,c}^{\max} [\bar{c}_{p,c}(t) + \beta] \tag{10}$$

which states that  $\mathcal{Lum}_c(t)$  at sufficiently short time  $t$  scales directly with the cell photoactivity profile  $\bar{c}_{p,c}(t)$  translated upwards by the  $\beta$  factor defined by Equation (6). All in all, Equations (8) and (10) reveal specific properties of bioluminescence signals by constitutive cells depending on  $t$ . As discussed in §4, these properties predicted by theory are well supported by experiments, and they further serve to constrain the evaluation of  $\bar{c}_{p,c}(t)$  from measured bioluminescence over time (cf. §3.3).

### 3.2. Comparison with Bioluminescence Expression for Metal-Inducible Whole-Cell Lux-Biosensor

The expression formulating the time-dependence of the bioluminescence  $\mathcal{Lum}(t)$  (in counts  $s^{-1}$ ) generated at  $t$  by specific metal (M)-inducible whole-cell biosensors reads as [39,40]

$$\mathcal{Lum}(t) = k_v V_T S_a K_{Hi}^{-1} k_f \tau_q c_p^{\max} J_{u,M} [F(t) \otimes \bar{c}_p(t)] \tag{11}$$

which, for the sake of simplicity, refers here to a monomodal bioluminescence signal. The reader is referred to [40] for extension of Equation (11) to multimodal biosensor response over time.

Equation (11) holds within the Henry M-biouptake regime and the linear Hill gene expression domain that guarantees linearity of  $\mathcal{Lum}(t)$  at any  $t$  versus total bulk metal concentration in solution, hereafter denoted as  $c_M^*$ , in accordance with experimental observation [39,40]. Equation (11) is further valid under non-depletive bulk metal conditions, in the absence of significant passive metal biosorption, and considering the initial boundary  $\mathcal{Lum}(t = 0) = 0$ , which is in line with the introduction of M in the medium at  $t = 0$  [23,39,48]. In Equation (11),  $K_{Hi}$  (in  $\text{mol m}^{-3}$ ),  $k_f$  ( $\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$ ),  $c_p^{\max}$  ( $\text{m}^{-3}$ ) and  $\bar{c}_p(t)$  (dimensionless) pertaining to metal-sensing cells are the analogues of  $K_{Hi,c}$ ,  $k_{f,c}$ ,  $c_{p,c}^{\max}$  and  $\bar{c}_{p,c}(t)$  defined in §3.1 for non-specific constitutive biosensors, respectively.  $K_{Hi}$  relates to the dissociation constant between metal-inducible promoter and M- $P_{\text{reg}}$  complex, with  $P_{\text{reg}}$  the regulatory proteins [39,53,54].  $J_{u,M}$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Equation (11) corresponds to the uptake flux of bioavailable metal ions, which includes contributions of both free metal species and labile metal complexes, as extensively discussed in [40]. It is stressed that the expression of  $J_{u,M}$  given in [40] involves the defining features of metal speciation dynamics, beyond the oversimplified equilibrium framework of the Biotic Ligand Model (BLM) and the cognate Free Ion Activity Model (FIAM) [30,32,36–38,40]. Within the Henry biouptake regime, the flux  $J_{u,M}$  is proportional to  $c_M^*$ , and the proportionality coefficient encompasses metal internalisation kinetics and metal speciation/bioavailability parameters [40]. Lastly, the time-dependent function  $F(t)$  in Equation (11) provides a rationale for the nonlinear coupling between the dynamics of M partitioning at the interface between photoactive cell sensor and aqueous medium, and the dynamics of intracellular processes leading to light emission [39]. As such,  $F(t)$  integrates the key timescales that relate to the production of M- $P_{\text{reg}}$  complexes (from the speciation-dependent bioaccumulation of M to the very intracellular recognition of M by  $P_{\text{reg}}$ ) and to luciferase activity inhibition. The latter is

subsumed in a kinetic constant denoted as  $k_r$  (in  $s^{-1}$ ), which is the equivalent of  $k_{r,c}$  for constitutive whole-cell biosensors.

Comparison between Equations (11) and (5) highlights striking differences in the mathematical structure of the expressions that capture the dependence of metal-responsive and constitutive cell signals on time, especially with regard to the way signals are mediated by the corresponding cell photoactivity profiles  $\bar{c}_p(t)$  and  $\bar{c}_{p,c}(t)$ , respectively. These differences originate from the distinct promoter-activation modes characteristic of the metal-sensing (non-constitutive) and constitutive cells: the extent of the ‘off-to-on’ transition of the promoter within an infinitesimal time interval  $dt$  is tied to the magnitude of  $S_a K_{Hi}^{-1} J_{u,M} c_p(t) dt$  (dimensionless) for the former biosensor type and to that of  $K_{Hi,c}^{-1} c_{p,c}(t)$  (dimensionless) for the latter. Despite these intrinsic differences, the purpose of the coming developments is to analyse the level of similarity between cell photoactivities  $\bar{c}_{p,c}(t)$  and  $\bar{c}_p(t)$  as derived from constitutive and non-constitutive bioluminescent responses measured in media defined by variable nutritional quality.

### 3.3. Inferring Time-Dependent Photoactivity of Constitutive Cells from Their Bioluminescence Signal

The procedure followed to estimate cell photoactivity  $\bar{c}_{p,c}(t)$  from the measured time-dependence of bioluminescence generated by constitutive cells,  $\mathcal{L}um_c(t)$ , is inspired by that detailed in [40] for metal-sensing cells. It relies on proper signal normalization and time-deconvolution. Namely, using Equation (5), the ratio between  $\mathcal{L}um_c(t)$  and  $\mathcal{L}um_c(t = t_{ref}) = \mathcal{L}um_{c,ref}$ , where  $\mathcal{L}um_{c,ref}$  is the bioluminescence measured at a selected timepoint,  $t = t_{ref}$ , satisfies the expression

$$\frac{\mathcal{L}um_c(t)}{\mathcal{L}um_{c,ref}} = \frac{\bar{c}_{p,c}(t) + \beta e^{-k_{r,c}t} - k_{r,c} \chi_c(t) \otimes \bar{c}_{p,c}(t)}{\bar{c}_{p,c}(t_{ref}) + \beta e^{-k_{r,c}t_{ref}} - k_{r,c} \chi_c(t_{ref}) \otimes \bar{c}_{p,c}(t_{ref})} \tag{12}$$

which offers the advantage to eliminate the prefactor  $k_v V_T K_{Hi}^{-1} k_{f,c} \tau_q c_{p,c}^{max}$  in Equation (5). Following [39], we further define  $\bar{c}_{p,c}(t)$  as a linear combination of  $N$  time-dependent sigmoids,  $f_{j=1,\dots,N}(t)$ , constructed from either the Gompertz model [57] or with help of the error function (erf), i.e.,

$$\bar{c}_{p,c}(t) = \sum_{j=1}^N r_j f_j(t) / \alpha \tag{13}$$

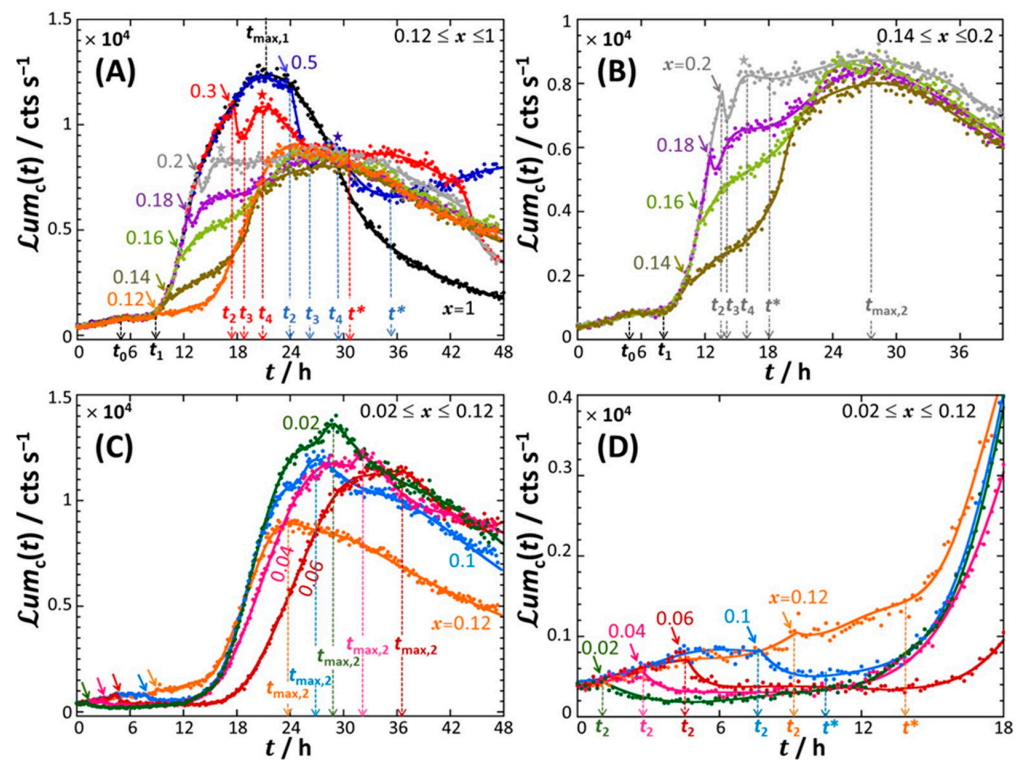
where  $r_{j=1,\dots,N}$  are scalars independent of time,  $f_{j=1,\dots,N}(t)$  satisfy the equalities  $f_{j=1,\dots,N}(t = 0) = 0$ , so that  $\bar{c}_{p,c}(t = 0) = 0$ , and  $f_{j=1,\dots,N}(t \rightarrow \infty) = 1$ . Unless otherwise specified,  $\alpha$  in Equation (13) is a normalization constant chosen to ensure the condition  $\bar{c}_{p,c}(t \rightarrow t_{last}) \rightarrow 1$ , with  $t_{last}$  the time at which the last bioluminescence measurement is performed ( $t_{last} = 48$  h under the conditions of interest here). Theoretical reconstruction of the measured time-dependent ratio  $\mathcal{L}um_c(t) / \mathcal{L}um_{c,ref}$  using Equations (12) and (13) was then realized upon adjustment of  $r_{j=1,\dots,N}$ ,  $\beta$ ,  $k_{r,c}$  and the set of parameters (3 per sigmoid) that describe the shape of the  $f_{j=1,\dots,N}(t)$  sigmoids and the time-domain where they are operational. A code written in PTC Mathcad Prime calculus environment was developed for that purpose, with (i) an optimized adjustment of parameters achieved by Levenberg–Marquardt solving algorithm, and (ii) an evaluation of the integral involved in the convolution product using adaptative quadrature method. Each bioluminescence signal subjected to theoretical analysis consisted in ca. 580 data points. Constrained parameter optimization was further added from the separate estimations of  $k_{r,c}$  and  $\beta$  on the basis of the simplified forms of  $\mathcal{L}um_c(t)$  given by Equations (8) and (10) that were used to fit measured bioluminescence data (after normalization by  $\mathcal{L}um_{c,ref}$ ) satisfying the conditions  $\tilde{t} < t \ll \tilde{t} + 1/k_{r,c}$  and  $k_{r,c}t \ll 1$ , respectively (cf. §3.1). For some of the medium conditions tested, the signal  $\mathcal{L}um_c(t)$  decreased abruptly with time, a feature we captured by adding to the sum in Equation (13) a term of the form  $g_{N+1}(t) = -r_{N+1} \left( 1 - e^{-(t-\tau_{N+1})/\alpha_{N+1}} \right)$ , where  $r_{N+1}$ ,  $\tau_{N+1}$ , and  $\alpha_{N+1}$  basically quantify the contribution of  $g_{N+1}(t)$  to the signal magnitude, the

time position where  $\mathcal{Lum}_c(t)$  starts to decrease with  $t$ , and the abruptness of that decrease, respectively. Overall, excellent reconstruction of measured bioluminescence signals could be achieved with  $N = 3$  to 5 depending on the medium conditions considered. Clearly, once the time-dependent ratio  $\mathcal{Lum}_c(t)/\mathcal{Lum}_{c,ref}$  is fitted according to Equations (12) and (13), non-normalized  $\mathcal{Lum}_c(t)$  can be compared with the one derived from theory after multiplication of  $\mathcal{Lum}_c(t)/\mathcal{Lum}_{c,ref}$  by  $\mathcal{Lum}_{c,ref}$ .

#### 4. Results and Discussion

##### 4.1. Description of the Time-Dependent Response of Non-Specific *rrnB* P1-*luxCDABE* *E. coli* Sensors versus Nutritional Medium Conditions

Figure 1 shows the bioluminescence response  $\mathcal{Lum}_c(t)$  of constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* *E. coli* biosensor in nGGM-0.1% tryptone media with varied concentrations of glucose (G) and xylose (X), as indicated by the parameter  $x = [G]/([G] + [X])$ . The results are provided here for a total Cd concentration  $c_{Cd}^*$  given by  $c_{Cd}^* = 20$  nM.



**Figure 1.** Dependence of the bioluminescence  $\mathcal{Lum}_c(t)$  on time  $t$  measured for the constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* *E. coli* biosensor in nGGM media supplemented with 0.1% tryptone and different concentrations of glucose and xylose, as subsumed in the sugar concentrations ratio  $x$  (specified) with  $0.02 \leq x \leq 1$ , at a total Cd concentration  $c_{Cd}^* = 20$  nM. For the sake of clarity, results are shown for  $0.12 \leq x \leq 1$  in (A) and are zoomed in (B) for  $0.14 \leq x \leq 0.2$  and  $t \leq 40$  h. Panel (C) displays the biosensor response collected for  $0.02 \leq x \leq 0.12$  and panel (D) provides a zoom of that response for  $t \leq 18$  h. In (A–D), colored symbols (filled circles) are measurements, and corresponding solid lines are theoretical reconstructions following the procedure detailed in §3.3 (Equations (12) and (13)). The nomenclature adopted here to detail the time-dependent patterns of the biosensor response (i.e., the colored stars and arrows, and the timepoints  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{max,1}$  and  $t_{max,2}$ ) is specified and further defined in the text. For the sake of data readability, timepoints are only positioned here for selected signals corresponding to  $x = 0.5$  (blue) and  $0.3$  (red) (panel (A)),  $x = 0.2$  (grey) (panel (B)), whereas signal annotations with relevant timepoints  $t_2$  and  $t_{max,2}$  are provided in (C) and (D) for all  $x$ -conditions reported therein (and  $t^*$  for the only signals  $x = 0.12$  and  $0.1$ ). Figure 2 reports the dependence of the maxima in bioluminescence on  $x$  and bulk Cd concentration. Figure 3 specifies the complete assignment of the relevant timepoints  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{max,1}$  and  $t_{max,2}$  for all  $x$  conditions and Cd concentrations tested.

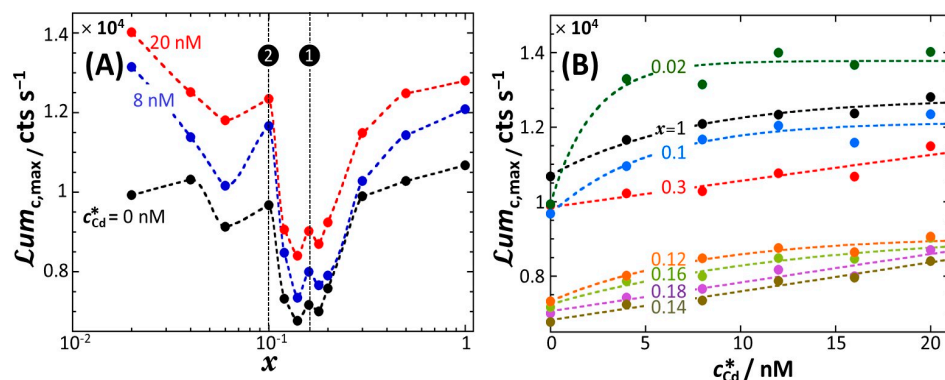
In the absence of xylose ( $x = 1$ ),  $\mathcal{Lum}_c(t)$  increases slightly with time  $t$  for  $0 < t < t_0 \approx 4.5$  h and then levels off for  $t_0 < t < t_1 \approx 8.5$  h at a plateau value of ca.  $0.2 \times 10^4$  counts  $s^{-1}$  (Figure 1A, black-colored curve). For  $t > t_1$ ,  $\mathcal{Lum}_c(t)$  takes the form of a bell-shaped signal with a ca.  $1.25 \times 10^4$  counts  $s^{-1}$  maximum reached at  $t = t_{\max,1} \approx 21$  h. The peak is asymmetric, and the long-term decay of the bioluminescence is so slow that  $\mathcal{Lum}_c(t)$  does not reach the value of 0 over the complete duration of the bioassay (Figure 1A). By decreasing the concentration of glucose from  $x = 1$  to  $x = 0.5$  (blue curve), the signal remains identical to that obtained for  $x = 1$  up to ca.  $t = t_2 \approx 24$  h (marked by a blue arrow in Figure 1A), both with respect to magnitude and shape. For  $t_2 < t < t_3 \approx 26$  h,  $\mathcal{Lum}_c(t)$  decreases abruptly with time, then increases to reach a local maximum at  $t = t_4 \approx 29$  h (marked by a blue star in Figure 1A) and finally slightly increases for  $t > t^* \approx 35$  h. With further decreasing  $x$  from 0.5 to 0.3 (red curve), the characteristic timescale  $t_2$  (red arrow in Figure 1A) introduced above to mark the onset of the abrupt decrease in bioluminescence, is now shifted to a lower value ( $t_2 \approx 17.6$  h at  $x = 0.3$ ), and the sudden decrease in bioluminescence now spans over a narrow time range, from  $t_2 \approx 17.6$  h to  $t_3 \approx 18.6$  h. The signal at  $x = 0.3$  subsequently reaches a local maximum at  $t_4 \approx 21$  h (marked by a red star in Figure 1A) before levelling off at  $t = t^* \approx 30$  h and decreasing for  $t > 43$  h.

At lower glucose contents (or, equivalently, larger xylose concentrations), i.e., for  $0.12 \leq x \leq 0.2$  (Figure 1A and zoom in Figure 1B), the characteristic timepoint  $t_2$  (marked by colored arrows in Figure 1A,B) clearly decreases with decreasing  $x$ , whereas the signal for  $t < t_2$  remains strictly similar to that measured at  $x \geq 0.3$ . In addition, the length  $t_3 - t_2$  of the interval  $t_2 < t < t_3$  where  $\mathcal{Lum}_c(t)$  drops sharply with  $t$ , is significantly reduced with decreasing  $x$ . In turn, this specific emission regime becomes difficult to identify at  $x = 0.16$ , and even more so at  $x = 0.14$  and  $x = 0.12$  (Figure 1A,B). For these two latter conditions, the characteristic timepoint  $t_3$  coincides with  $t_2$ , and the timepoint  $t_4$  also effectively coincides with  $t_2$  as there is no local maximum to be clearly recognized in the signals. In turn, the well-defined local maxima detected at  $t = t_4$  for  $x = 0.5$  and 0.3 (cf. corresponding colored stars in Figure 1A) leave place at lower  $x$  to a local shallow maximum (observed for  $x = 0.2$ , grey star in Figure 1A,B), and to a quasi-plateau ( $x = 0.18$ ) or an increase in bioluminescence with  $t$  ( $x = 0.16$  and 0.14) both spanning over the range  $t_4 < t < t^* \approx 18$  h (Figure 1B). These signal modifications precede the establishment of a maximum in bioluminescence at  $t = t_{\max,2} \approx 24$  h–28 h for  $0.12 \leq x \leq 0.2$  (Figure 1A,B). The amplitude of that maximum as counted from the signal value at, e.g.,  $t = t_4$  taken as a reference, i.e.,  $\mathcal{Lum}_c(t = t_{\max,2}) - \mathcal{Lum}_c(t = t_4)$ , increases noticeably with decreasing  $x$ . Remarkably, the signal decreases linearly with time for  $t > t_{\max,2}$  (Figure 1B) and the associated slope is basically independent of  $x$  for the range  $0.12 \leq x \leq 0.2$ .

With a further decrease in  $x$  from 0.12 to 0.02 (Figure 1C,D), the long-term signal still exhibits a peak for  $t \geq t^*$  whose maximum is reached at  $t_{\max,2} \approx 24$  h, 27 h, 37 h, 32 h and 29 h for  $x = 0.12, 0.1, 0.06, 0.04$  and 0.02, respectively. In addition, with decreasing  $x$  the bioluminescence is shifted to larger values within the time range  $t > t_{\max,2}$  where  $\mathcal{Lum}_c(t)$  decreases linearly with  $t$  (linearity evidently applies for  $x = 0.12, 0.10, 0.06$  and 0.04). Most interestingly, Figure 1C,D show that the short-term response ( $t < 10$  h) is significantly affected upon decreasing  $x$  from 0.12 to 0.02, a feature that was not observed for signals measured at larger glucose concentrations. Namely, the timepoints  $t_0$  and  $t_1$  defined in Figure 1A,B for  $0.12 < x \leq 1$  become immaterial for  $x \leq 0.12$  as the corresponding cell signals in the early stage of the response now first increase slightly with time before decreasing sharply beyond a timepoint (marked by the colored arrows in Figure 1C,D) that labels a discontinuity of the signal derivative with respect to  $t$ . This timepoint actually corresponds to the characteristic time  $t_2$  (Figure 1D) introduced in Figure 1A,B, with the difference that the abrupt decrease in  $\mathcal{Lum}_c(t)$  at  $t = t_2$  now occurs within the first hours ( $< 10$  h) of the response. Quantitatively, by decreasing  $x$  from 0.12 to 0.02,  $t_2$  decreases from ca. 9 h to 1 h, whereas the envelope of the signal over the range  $0 < t < t_2$  remains the same under all  $x$ -conditions tested (Figure 1D). Similarly, the time point  $t^*$  that positions the foot of the maximum reached at  $t = t_{\max,2}$  is shifted to lower values with decreasing  $x$  (Figure 1D).

As an intermediate conclusion, Figure 1 highlights a peculiar typology of the constitutive cell signals with varying the concentration and source of carbon in the medium, namely: a specific short-term response ( $t_{0,1,2}$ ) depending on  $x$ , the occurrence of an abrupt decrease (hereafter referred to as ‘truncation’) in bioluminescence at  $t = t_2$  either in the short-term or long-term emission regimes, the presence of a maximum ( $t_{\max,1}, t_{\max,2}$ ) and/or a local maximum ( $t_4$ ), and a linear decrease in the signal in the long-term for many of the examined situations.

Figure 2 reports the maximum value of bioluminescence measured over the complete duration of the bioassay, denoted hereafter as  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$ , as a function of  $x$  and total Cd concentration  $c_{Cd}^*$ . At fixed value of  $x$ ,  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  increases with  $c_{Cd}^*$  (Figure 2A), which may be counterintuitive given that *rrnB* P1 promoter is not inducible by Cd. This finding actually relates to Cd-induced hormesis effects. Hormesis refers to the response of many living organisms, including bacteria, to a large spectrum of chemicals found to exert opposite effects at low and high doses. It is generally viewed as an adaptive or overcompensation cell defence mechanism aimed at recovering the cell state prior to exposure to the chemical [58]. The rate of variation of  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  when changing the glucose-to-xylose concentration ratio remains independent of  $c_{Cd}^*$  (Figure 2A). Overall,  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  decreases with decreasing  $x$ ; it passes through a minimum at  $x = 0.14$  and basically increases with further decreasing  $x$  to 0.02 (Figure 2A). This minimum coincides with the condition of  $x$  marking the transition between time-dependent cell response featuring an abrupt decrease (or truncation) in the signal, either in the long-term emission (i.e.,  $t_2 > 10$  h, Figure 1A,B) or in the short-term emission mode positioned at the foot of the bioluminescence peak located at  $t = t_{\max,2}$  (i.e.,  $t_2 < 10$  h, Figure 1C,D). Interestingly, closer inspection of Figure 2A reveals the presence of local extrema in the dependence of  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  on  $x$ , as materialized by the dotted lines ① and ② in Figure 2A at  $x = 0.16$  and  $x = 0.1$ , respectively. The extremum ① corresponds to the nutritional condition where the local maximum in  $\mathcal{Lum}_c(t)$  observed at  $x = 0.5$  and  $0.3$  (marked by a blue and red star in Figure 1A, respectively) is entirely replaced by the time-domain where  $\mathcal{Lum}_c(t)$  increases with  $t$  for  $t_4 < t < t^*$  (Figure 1B). The other extremum ② is associated with the cell signal defined by a significant truncation in the short-term emission regime ( $t < 10$  h) (Figure 1D). As a last remark, Figure 2B evidences that  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  is most significantly impacted by Cd at low  $c_{Cd}^*$ , as judged by the trends observed for the extremes  $x = 1$  and  $x = 0.02$ . This finding is consistent with the hormesis effects invoked above. Additionally, the magnitude of these effects is clearly depending on  $x$ . This is in line with the idea that any adaptation of the biosensors to prevent cell damage by Cd is subject to the use of bioavailable and metabolizable nutriment.



**Figure 2.** Dependence of the maximum ( $\mathcal{Lum}_{c,\max}$ ) of the bioluminescence signals reported in Figure 1A–C on  $x$  for selected values of  $c_{Cd}^*$  (indicated) (A), and dependence of  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  on  $c_{Cd}^*$  for selected values of  $x$  (indicated) (B). Symbols are measurements, and dotted lines are guides to the eye. The color-based nomenclature in (B) is identical to that adopted in Figure 1. The dotted lines ① and ② in (A) position the characteristic local extrema observed in the dependence of  $\mathcal{Lum}_{c,\max}$  on  $x$ . See text for details.

For the sake of completeness, we report separately in Figure 3 the time-dependent responses of the constitutive biosensor for each  $x$ -condition tested and for the various adopted Cd concentrations in the range 0 to 20 nM (Figure 3A–L). For readability purposes, signals are here presented in the dimensionless form defined by  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t) = \mathcal{L}um_c(t) / \mathcal{L}um_c(t = t_{ref})$  (cf. §3.3) with  $t_{ref}$  the time point where  $\mathcal{L}um_c$  is at its maximum in the range  $0 < t < 10$  h. For each condition of  $x$ , we further systematically specify the positioning of the relevant timepoints  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{max,1}$  and/or  $t_{max,2}$  introduced above to describe the signal patterns featured in Figure 1. The new finding inferred from Figure 3 is that the shape of the cell signal, its defining properties (including, e.g., the presence/absence of truncation in either the short-term or long-term response, or the positioning of the local and/or overall maxima depending on  $x$ ) are not affected by  $c_{Cd}^*$ . This conclusion conforms to that derived from the consideration of the only maximal signal amplitude in Figure 2A. In turn, the measurements performed at different values of  $c_{Cd}^*$  support the repeatability of the time-dependent bioluminescence data, and they ensure that the remarkable evolution of  $\mathcal{L}um_c(t)$  with time and  $x$ , as discussed in Figure 1, is not an artifact.

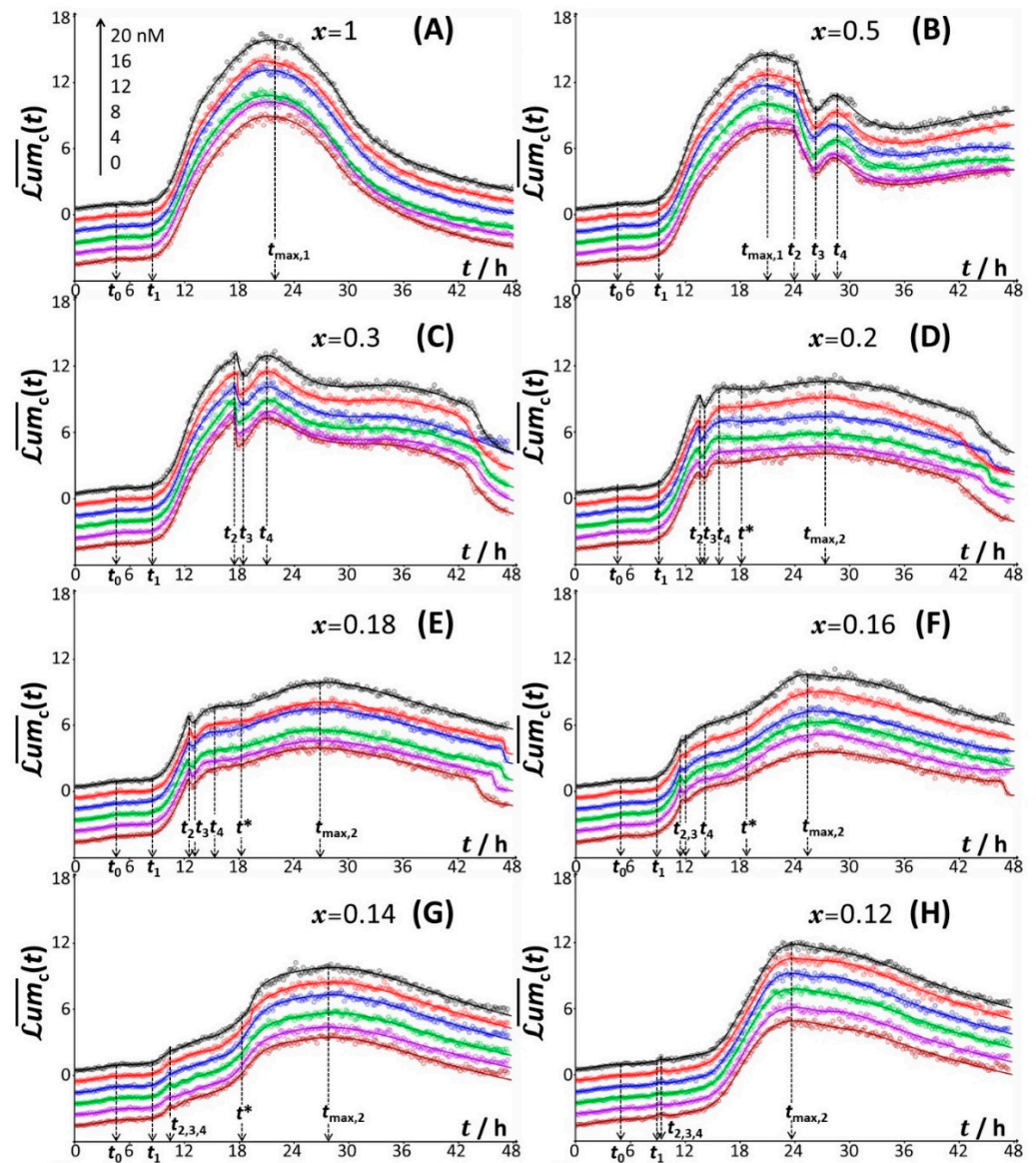
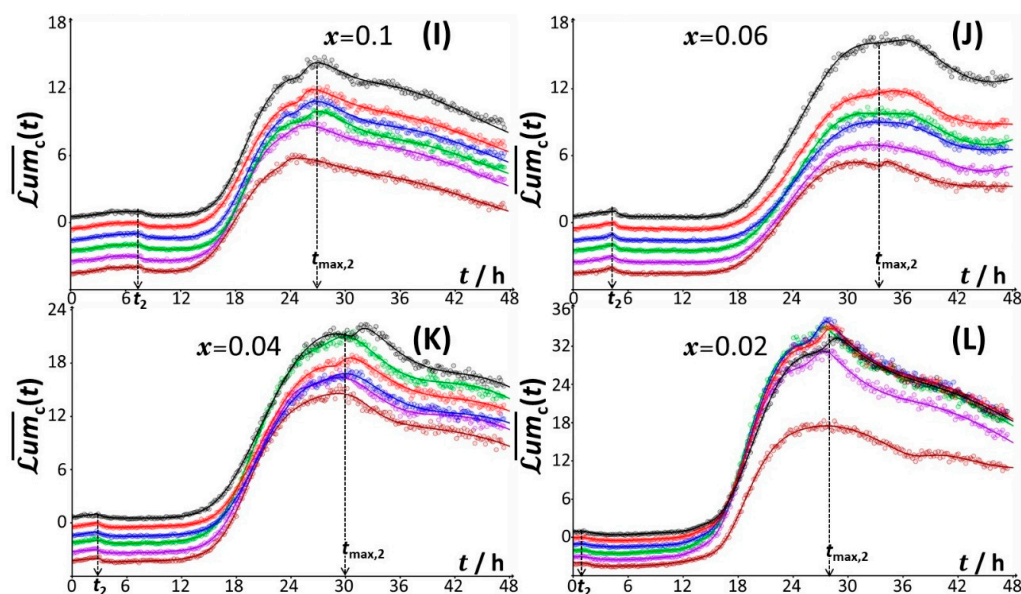


Figure 3. Cont.





**Figure 3.** Dependence of the dimensionless bioluminescence  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t) = \mathcal{L}um_c(t) / \mathcal{L}um_c(t = t_{\text{ref}})$  for the constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* *E. coli* biosensor on time  $t$  for different concentrations of glucose and xylose, as subsumed in the parameter  $x$  with  $0.02 \leq x \leq 1$  (indicated).  $t_{\text{ref}}$  corresponds here to the timepoint where  $\mathcal{L}um_c(t)$  is maximal within the time domain 0 to 10 h. Results are given for different total concentrations of Cd,  $c_{\text{Cd}}^*$ , in the range 0–20 nM and the color nomenclature specified in panel (A) for  $c_{\text{Cd}}^*$  also applies to panels (B–L). For the sake of clarity and curves readability,  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$  profiles corresponding to  $c_{\text{Cd}}^* = 16, 12, 8, 4$  and 0 nM are shifted downwards by  $-1, -2, -3, -4$  and  $-5$ , respectively. In (A–L), symbols (empty circles) are measurements, and plain lines are theoretical reconstructions following the procedure detailed in §3.3 (Equations (12) and (13)). The nomenclature adopted to detail the time-dependent patterns of the constitutive biosensor response (i.e., the timepoints  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{\text{max},1}$  and  $t_{\text{max},2}$ ) is here systematically specified for each  $x$ -condition.

Figure 3 further illustrates the successful reconstruction of the biosensor signals collected under all measuring conditions on the basis of the theoretical formalism detailed in §3.1 and §3.3. In the next section, the mechanisms underlying the connections between cell response typology (Figures 1 and 3) and cell metabolism at stake are discussed together with the outcome of the modelling.

#### 4.2. Rationale for the Dependence of Constitutive Cell Response on Time

With the objective to explain the peculiar variations of  $\mathcal{L}um_c$  on time  $t$  and nutritional medium conditions (subsumed in the variable  $x$ ), we provide a thorough comparison between bioluminescence signal for all tested conditions in Figure 4 (Figure 4, panels (a)) and associated cell photoactivity (Figure 4, panels (b)) measured and derived from theory (cf. §3), respectively, for both the constitutive biosensor and its cognate (non-constitutive) Cd-inducible *PzntA-luxCDABE Escherichia coli* system. For the latter biosensor type, the experimental and theoretical data refer to those reported and extensively discussed in our previous report [40] for  $x$ - and  $c_{\text{Cd}}^*$ -conditions that are identical to those adopted in the current study for the constitutive cells.

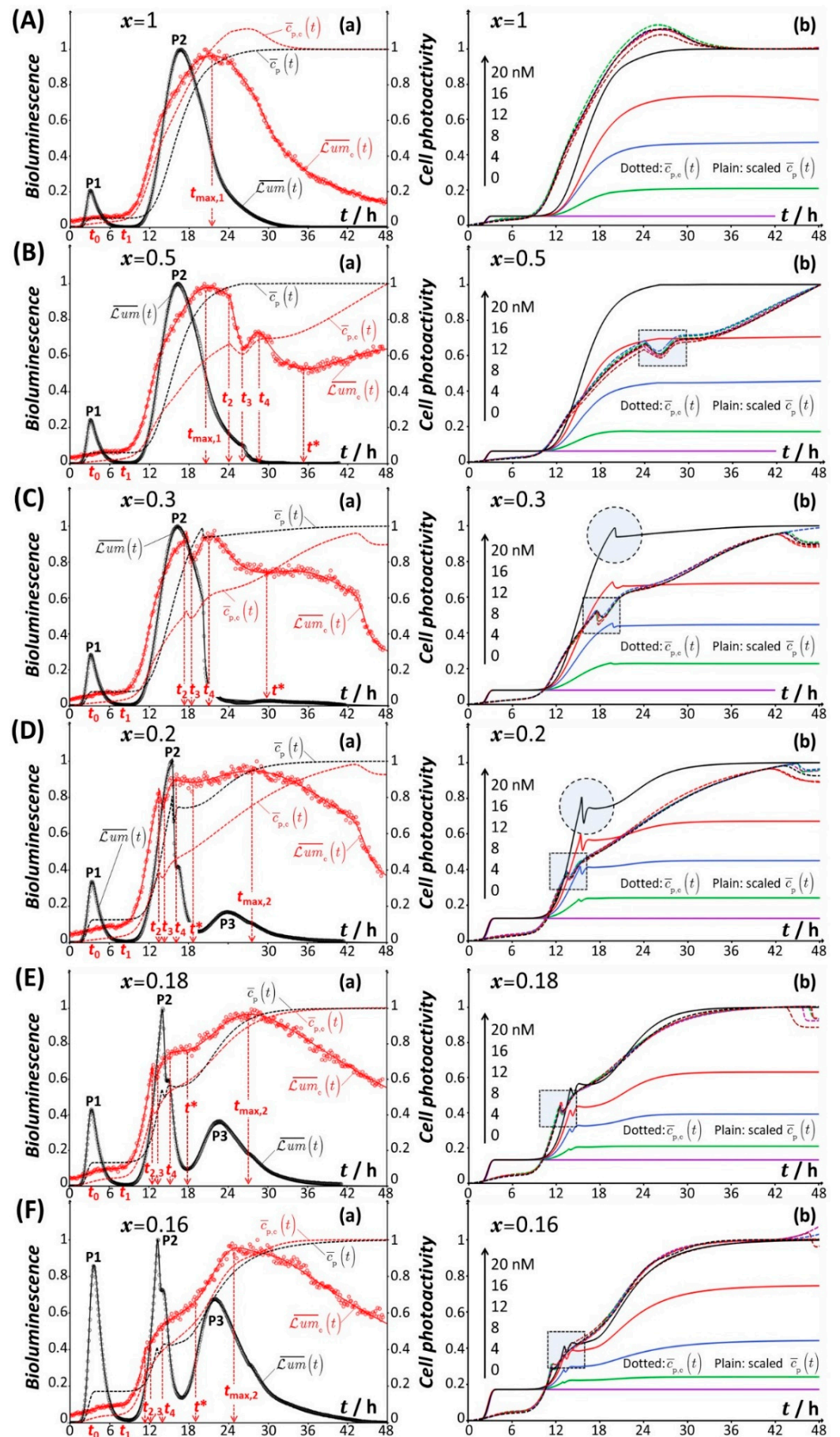


Figure 4. Cont.

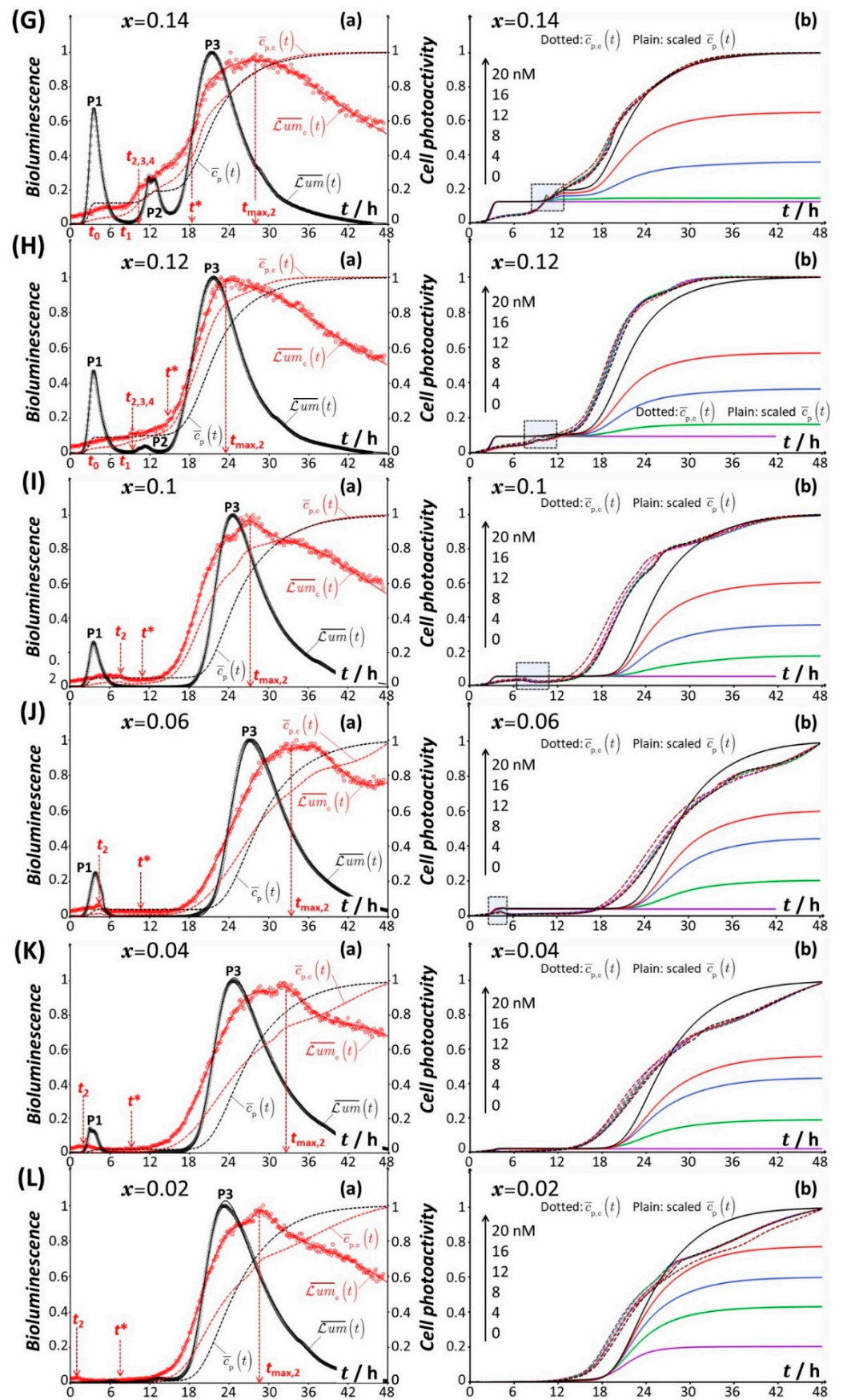


Figure 4. Cont.

**Figure 4.** (a) Comparison between dimensionless time-dependent bioluminescence for constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* ( $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$ , red color) and non-constitutive Cd-responsive ( $\overline{\mathcal{L}um}(t)$ , black color) *E. coli* whole-cell biosensors at  $c_{Cd}^* = 20$  nM for different values of  $x$  ( $0.02 \leq x \leq 1$ , indicated) with corresponding (dimensionless) cell photoactivity  $\bar{c}_{p,c}(t)$  and  $\bar{c}_p(t)$  (red and black dotted lines, respectively). Plain lines are theoretical reconstructions of the bioluminescence profiles following the procedure detailed in §3.3 (Equations (12) and (13)) for the constitutive cells (red) and the procedure given in [40] for the metal-responsive cells (black, Equation (11) in §3.2). Black and red empty circles correspond to measurements. (b) Cell photoactivities  $\bar{c}_{p,c}(t)$  (dotted lines) and  $\bar{c}_p(t)$  (plain lines) estimated from theoretical analysis of the bioluminescence response of the constitutive and non-constitutive cells, respectively, for the different total Cd concentrations tested (indicated by the scale arrow) at selected  $x$  (indicated). For comparison purpose, the  $\bar{c}_p(t)$  reported in [40] for different  $c_{Cd}^*$  in the range 0–20 nM are all multiplied by the factor  $1/\bar{c}_p(t = 48\text{h})$  estimated at  $c_{Cd}^* = 20$  nM, and bioluminescence cell signals are here normalized with respect to their respective maximal values. Panels (A–L) refer to the different values of  $x$  of interest in this work (indicated). P1, P2, and P3 correspond to the characteristic bioluminescence peaks detected in the signal of the Cd-responsive biosensor. The nomenclature adopted to detail the time-dependent response patterns of the constitutive biosensor (i.e., the timepoints  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{max,1}$  and/or  $t_{max,2}$ ) is specified for each  $x$ -condition. Filled dotted circles and filled dotted squares drawn in some of the panels (b) pinpoint remarkable features of  $\bar{c}_p(t)$  and  $\bar{c}_{p,c}(t)$ , respectively. See text for details.

To ease comparison, bioluminescence signals in Figure 4 are all normalized with respect to their maximum values, and they are thus reported in the dimensionless form  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t) = \mathcal{L}um_c(t)/\mathcal{L}um_{c,max}$  and  $\overline{\mathcal{L}um}(t) = \mathcal{L}um(t)/\mathcal{L}um_{max}$  for the constitutive and non-constitutive *E. coli* whole-cell biosensors, respectively. As in Figure 3, all relevant timepoints  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t^*, t_{max,1}$  and/or  $t_{max,2}$  are systematically reported in Figure 4. To further compare the corresponding cell photoactivity patterns  $\bar{c}_{p,c}(t)$  and  $\bar{c}_p(t)$  derived from theory (cf. §3) at given  $x$  and  $c_{Cd}^*$ , the values of  $\bar{c}_p(t)$  reported in Figure 10 of Reference [40] are multiplied here by the quantity  $1/\bar{c}_p(t = 48\text{ h})$  evaluated for the situation where  $c_{Cd}^* = 20$  nM. In turn, the so-scaled cell photoactivity  $\bar{c}_p(t)$  of non-constitutive cells identifies at 20 nM Cd concentration and at  $t = 48$  h, to  $\bar{c}_{p,c}(t = 48\text{ h})$ , which is unity according to the here-adopted convention (cf. §3.3).

#### 4.2.1. Mechanistic Correspondence between Bioluminescence Signals of Constitutive and Non-Constitutive Cells

We first briefly summarize the main conclusions derived in [40] on the origins of the changes in the response of the non-constitutive (metal-responsive) biosensor with varying  $t, x$  and  $c_{Cd}^*$  (Figure 4, left column, black curves).

For the situation where the medium supply of glucose to the sensing cells is not limited ( $x = 1$ ), the  $\overline{\mathcal{L}um}(t)$  signal comprises two successive peaks over time, denoted as P1 and P2 (Figure 4A). These peaks define two different light emission regimes: the first regime is driven by the biouptake and utilization of the amino acids bioavailable in solution (P1), and the second follows transitory cell stringent response (i.e., intracellular synthesis of amino acids) (P2). The respective amplitudes of P1 and P2 are further linearly related to  $c_{Cd}^*$  for the 0–20 nM range of Cd concentration [40]. By shifting the carbon source gradually from glucose to xylose (Figure 4B,C), the P2 signal exhibits a clear truncation due to a significant decrease in glucose concentration in the medium and to glucose-mediated repression of acetate, a product of the intracellular degradation of glucose. Under such conditions, xylose repression by glucose is also operational. When glucose deficiency in the medium becomes more significant (Figure 4D–H), acetate repression is stopped and acetate then becomes metabolized as described in [40]. This translates into a shouldering (Figure 4D–F) and even a doubling (Figure 4G,H) of peak P2. The modifications of P2 in Figure 4B–H are accompanied by a progressive extinction of the P2 signal component, and full suppression of the latter is achieved at sufficiently low glucose concentrations (Figure 4I–L). The shouldering, doubling, and suppression of P2 with decreasing  $x$  from 0.2

to 0.02 are further accompanied by the apparition of a third peak in the long-term response, denoted as P3, whose amplitude increases from  $x = 0.2$  to 0.02 (Figure 4D–L). This third regime of light production is dictated by the metabolization of xylose resource, rendered possible after cells have ended their repression of xylose operative at  $x > 0.3$ . Under extreme  $x$ -conditions underlying a severe deficiency in glucose (Figure 4J–L), modifications of the short-term P1 response are clearly noticeable with the occurrence of a truncation, doubling, and finally an extinction of peak P1 at  $x = 0.02$ . Glucose concentration is then too low to sustain amino acid uptake/utilization and subsequent production of light in this emission regime.

At first glance, Figure 4 evidences that the shape of the bioluminescence response  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$  of constitutive cells, as detailed in Figures 1 and 3 (cf. §4.1), does not share many of the aforementioned markers of the well-identifiable multimodal signals  $\overline{\mathcal{L}um}(t)$  produced by non-constitutive cells (P1-P2, P1-P2-P3, P1-P3 and P3 peak responses operate with decreasing  $x$  from 1 to 0.02). Additional differences between  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$  and  $\overline{\mathcal{L}um}(t)$  relate to the initial amplitude of the signal at  $t = 0$  with  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t = 0) \neq 0$  and  $\overline{\mathcal{L}um}(t = 0) = 0$ . This difference is explained by the distinct functioning principles of both biosensors. Indeed, *rrnB* P1-*luxCDABE* cells are cultured overnight in rich LB growth media (cf. §2.2) prior to bioluminescence measurements. As a result, the intracellular concentration level of luciferase is not 0 immediately after the transfer of the cells into the measuring incubation medium (nGGM-0.1% tryptone of given  $x$ ) because of the fusion of *rrnB* P1 to the *lux*-operon. Cells have thus already synthesized the required luciferase for light production at  $t = 0$  and, therefore,  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t = 0) \neq 0$ , which is in line with observation in [23]. Unlike for constitutive cells, the intracellular concentration of luciferase at  $t = 0$  is 0 for Cd-responsive biosensors because the overnight culture medium is lacking the Cd metal ions that trigger the production of luciferase. The apparent high level of overall dissimilarity between  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$  and  $\overline{\mathcal{L}um}(t)$  signals further echoes the differentiated structure of their defining theoretical time-dependent expressions (cf. Equation (5) versus Equation (11), respectively, and further discussion in §4.2.2).

On the basis of Figure 4 and at the light of the results derived in [40] for the non-constitutive cells, a mechanistic correspondence between the time-dependent patterns  $\overline{\mathcal{L}um}(t)$  and  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$  can be formulated. Namely, the peak P1 (mediated by the uptake/utilization of amino acids from solution) detected for the non-constitutive cells formally corresponds to the early stage response of the constitutive biosensors, i.e.,  $0 \leq t \leq t_1$  for  $0.12 \leq x \leq 1$  (Figure 4A–H) and  $0 \leq t \leq t^*$  for  $0.04 \leq x \leq 0.1$  (Figure 4I–K). This first emission regime is poorly resolved for constitutive cells at  $x = 0.02$  (Figure 4L), in agreement with the corresponding suppression of peak P1 for their non-constitutive analogues under such  $x$ -condition. The peak P2 (that follows stringent control of intracellular proteins synthesis) identifies formally with the response of the constitutive cells over the time range  $t > t_1$  at  $x = 1$  (Figure 4A) and  $t_1 \leq t \leq t^*$  for  $0.12 \leq x \leq 0.5$  (Figure 4B–H). The maximum of that signal component is reached at  $t = t_{\max,1}$  ( $x = 1$  and 0.5, Figure 4A,B), and  $t = t_4$  or  $t = t^*$  for  $0.12 \leq x \leq 0.3$  (Figure 4C–H). For  $x \leq 0.1$  (Figure 4I–L), it is virtually impossible to recognize a specific intermediate regime that separates the short- and long-term responses of the constitutive sensors, in agreement with the corresponding suppression of peak P2 for non-constitutive cells. Finally, the analogue of peak P3 associated with xylose metabolism by non-constitutive cells can be clearly tracked in the signal of the constitutive sensors at  $t \geq t^*$  and  $x \leq 0.2$  (Figure 4D–L): the maximal amplitude of the signal in this third long-term emission regime is clearly reached at  $t = t_{\max,2}$ .

There are additional supports for the sound basis of the above equivalence drawn between  $\overline{\mathcal{L}um}(t)$  and  $\overline{\mathcal{L}um}_c(t)$  and for the underlying connections between signal shapes (regardless of their respective complexity) and operational metabolic pathways. Indeed, the truncations of the bioluminescence signals in the first and second emission regimes of metal-responsive cells can be spotted at  $t = t_2$  (depending on  $x$ ) for the non-constitutive sensors, with an abrupt decrease in the bioluminescence signal for  $t_2 \leq t \leq t_3$ . In addition, when glucose deficiency in the medium is significant, the exploitation of acetate by

non-constitutive sensors translates into a shouldering/doubling of peak P2, whereas, for constitutive cells, it is actually reflected by an increase in the signal with time for  $t_3 \leq t \leq t_4$  (Figure 4D–H). Lastly, the non-monotonous dependence of  $\mathcal{L}um_{c,\max}$  on  $x$  evidenced in Figure 2 reflects the gradual suppression of the second emission regime (post-stringence) upon decreasing  $x$  from 1 to 0.12–0.14 and the growing contribution of the long-term signal (marking cell utilization of xylose) for  $x$  running from 0.12–0.14 to 0.02. As argued in [40] for non-constitutive cells, the local extrema highlighted in Figure 2 at intermediate  $x$  likely originate from the simultaneous (and not necessarily sequential [59,60]) utilizations of different carbon sources (glucose, xylose and/or acetate) depending on cell energetic trade-offs and demands. These extrema are the analogues of those observed in [40] for the dependence of the peak P1 amplitude on  $x$  (see Figure 5A in [40]).

Overall, Figure 2 therefore combines qualitatively the defining amplitudes of P1, P2, and P3 detailed in [40] for metal-responsive cells upon modulation of the nutritional medium conditions. This parallel between specific and non-specific biosensors that generate very different time-dependent bioluminescence signals is all the more remarkable that their respective sensitivities differ significantly, with a  $\mathcal{L}um_{\max}$  that can be up to two orders of magnitude larger than  $\mathcal{L}um_{c,\max}$  over the ensemble of medium compositions considered [40]. Such a difference in sensitivity is the result of the distinct engineering of the constitutive and non-constitutive sensing cells, which leads to contrasting amounts of *lux*-reporter genes. As a last remark, we observe from Figure 4 that the timescale and onset of the second and third emission regimes under given  $x$  condition is different for both types of sensing cells. This latter aspect is clarified in the next section with the analysis of the time-dependent cell photoactivity profiles derived by time-deconvolution of the measured bioluminescence signals according to Equation (12) (case of constitutive cells) and Equation (11) (case of non-constitutive cells, cf. [40]).

#### 4.2.2. Comparison between Time-Dependent Cell Photoactivity Profiles for Constitutive and Non-Constitutive Cells

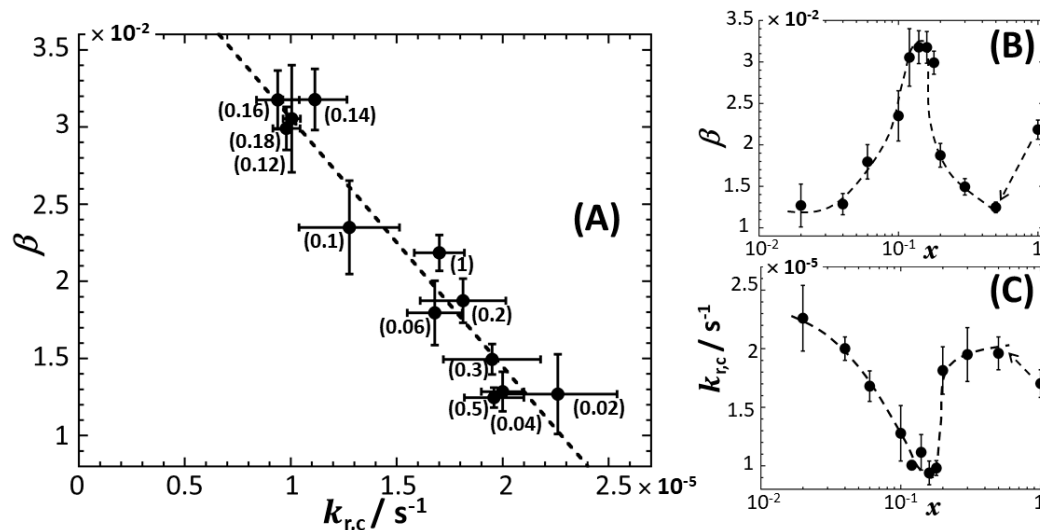
The (scaled, cf. introduction of §4.2) cell photoactivity profiles  $\bar{c}_p(t)$  reported in Figure 4 for metal-responsive sensors at different Cd concentrations in the 0–20 nM range (right column, solid-colored lines) were derived in [40] from deconvolution of the bioluminescence signal following Equation (11). Briefly, for given values of  $c_{Cd}^*$  and  $x$ ,  $\bar{c}_p(t)$  takes the form of 1, 2, or 3 successive sigmoids depending on the number of detected peaks (P1, P2 and P3). This conversion of bioluminescence peaks into increasing sigmoidal function of time is the direct consequence of the convolution product that underlies the connection between bioluminescence and amount of (photoactive) cells over time. By construction, the  $\bar{c}_p(t)$  profiles were obtained from the time-deconvolution of the signals normalized by the amplitude of peak P1 (the latter increases linearly with  $c_{Cd}^*$ ) [40]. In turn, this explains why  $\bar{c}_p(t)$  at fixed value of  $x$  does not depend on  $c_{Cd}^*$  within the time domain where the first emission regime prevails (see [40] for further details). In the time domains corresponding to the second- and third-emission regimes,  $\bar{c}_p(t)$  increases at given  $t$  with  $c_{Cd}^*$ , which is a consequence of the linear increase in the P2 and P3 amplitudes with increasing  $c_{Cd}^*$ . Most importantly, in bimodal P1–P2 signal configuration, the truncation of peak P2 due to acetate repression by glucose is materialized by an abrupt decrease in  $\bar{c}_p(t)$  with time followed by a plateau value reached when bioluminescence approaches 0 value (Figure 4C(b), cf. dotted circle therein). When there is repression of acetate by glucose and a subsequent use of acetate by the cells after that repression is turned off (Figure 4D), the corresponding truncation and shouldering of P2, respectively, lead to a local and abrupt peaked variation of  $\bar{c}_p(t)$  materialized by the dotted circle in Figure 4D(b). Similar features can be identified when zooming in on the part of the  $\bar{c}_p(t)$  profiles that correspond to a truncated P1 signal (Figure 4J–K) as a result of early catabolite repression at sufficiently low values of  $x$  [40].

Unlike for metal-detecting cells, the cell photoactivity profiles  $\bar{c}_{p,c}(t)$  derived for the constitutive sensor using Equations (12) and (13) are basically independent of  $c_{Cd}^*$  under all  $x$ -conditions tested. This property agrees with the construction of this sensor

type and with the normalisation adopted for  $\bar{c}_{p,c}(t)$  which leads to scaling of data with respect to metal-induced hormesis effects. All  $\bar{c}_{p,c}(t)$  curves feature an increase in the number of photoactive cells over the full duration of the bioluminescence assays, and some are marked by a plateau value reached at large time (Figure 4A,E–I). Exceptions include the conditions  $x = 0.5, 0.3, 0.2, 0.06, 0.04,$  and  $0.02$  (Figure 4B–D,J–L) for which  $\bar{c}_{p,c}(t)$  curves do not exhibit such a plateau at the end of the assay. This latter finding is consistent with the absence of a linear decrease in  $\mathcal{Lum}_c(t)$  with time in the long-term cell response (cf. Equation (8) and validity conditions thereof). In contrast, this linear decrease in  $\mathcal{Lum}_c(t)$  with time, as predicted by the theory under the conditions underlying the applicability of Equation (8), is very well observed in Figure 4E–I. In addition, conformably to Equation (10) valid at the sufficiently short time  $t$ , in the initial stage of the response the bioluminescence signals,  $\mathcal{Lum}_c(t)$  closely follows the  $\bar{c}_{p,c}(t)$  profiles within a constant  $\beta$  that defines the amplitude of  $\mathcal{Lum}_c(t = 0)$  (cf. Equation (7)). Most strikingly, specific changes in  $\bar{c}_{p,c}(t)$  in the form of local minima or local peaked changes of the profiles (Figure 4B–H, panels (b) and cf. dotted squares therein) are observed within the time domains marking acetate and/or xylose repressions by glucose. These peculiarities of the cell photoactivity patterns  $\bar{c}_{p,c}(t)$  are strongly reminiscent of those discussed for their metal-responsive analogues, despite of the pronounced differences in the respective shapes of  $\mathcal{Lum}_c(t)$  and  $\mathcal{Lum}(t)$  signals. This is especially obvious when comparing  $\bar{c}_{p,c}(t)$  and  $\bar{c}_p(t)$  for  $x = 0.18, 0.16,$  and  $0.14$  (Figure 4E–G). Under the  $x$ -conditions marking a transition between significant suppression and increases in the second and third emission regime, respectively (cf. §4.1), the observation of the aforementioned associated characteristics of  $\bar{c}_{p,c}(t)$  becomes more difficult even though data zooming reveal uncontestably their presence. A similar conclusion applies at sufficiently low values of  $x$  where the short-term emission regime is gradually suppressed with accompanying truncation of both  $\mathcal{Lum}_c(t)$  and  $\bar{c}_{p,c}(t)$  (Figure 4H–J, panels (b), see dotted squares therein).

The above analogy between  $\bar{c}_{p,c}(t)$  and  $\bar{c}_p(t)$  is a strong marker of the sound foundations of Equation (5) and Equation (11) adopted to interpret the bioluminescence response of engineered bacteria displaying very distinct sensing functionality. Their relative comparison highlights that, e.g., the second emission regime (corresponding to peak P2 for non-constitutive cells) is reached at a shorter time by constitutive cells (Figure 4A) and that acetate “on-off” repression processes are achieved by these cells type at lower  $x$  and shorter  $t$  (Figure 4B–H) compared with metal responsive cells. This difference in the delay of apparition of catabolite repression is a result of the different rate of initial luciferase production at  $t = 0$  for both sensors (§4.1).

Lastly, in Figure 5, we provide the values obtained for the constant  $\beta$  and  $k_{r,c}$  involved in the expression of  $\mathcal{Lum}_c(t)$  for all medium compositions (Equations (5) and (12)). It is found that  $k_{r,c}$  lies in the range  $\sim 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  to  $2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  depending on  $x$ , from which we infer that the characteristic timescale for effective light inhibition varies between 11 h and 27 h. This magnitude of  $1/k_{r,c}$  is significantly larger than the  $\sim 10$  to 25 min value of  $1/k_r$  derived for metal-responsive cells from bioluminescence signal reconstruction on the basis of Equation (11) [40]. Following the reasoning in [40] and referring to the conclusion by Iqbal et al. [61], we argue that such a difference between  $1/k_{r,c}$  and  $1/k_r$  is tied to the extent of luciferase production inhibition by flavine mononucleotide (FMN), a product of the bioluminescence reaction. The more significant is the production of light, the higher is the intracellular FMN concentration, and the more pronounced the inhibition of the bioluminescence reaction becomes. In turn, this converts into a larger (lower) effective kinetic constant (timescale, respectively) for the inhibition of the bioluminescence reaction. This explanation is consistent with the fact that metal-responsive cells generate significantly more light (up to two orders of magnitude more [40]) than their constitutive analogues for a given nutritional medium composition, a feature that is inherent to their genetic construction. In agreement with the behaviour of  $\mathcal{Lum}_c(t)$  at  $t = 0$ ,  $\beta$  (dimensionless) is not 0 (Equation (7)) and is found to vary between  $\sim 1.2 \times 10^{-2}$  and  $\sim 3.2 \times 10^{-2}$  over the range of the  $x$ -conditions tested. Figure 5A further evidences an overall decrease in  $\beta$  with  $k_{r,c}$ .



**Figure 5.** Parameters  $\beta$  (dimensionless) and  $k_{r,c}$  (in  $s^{-1}$ ) derived from the analysis of bioluminescence response of constitutive *rrnB* P1-*luxCDABE* whole-cell biosensors using Equations (12) and (13) (cf. §3.3). (A) Variation of  $\beta$  versus  $k_{r,c}$ . Numbers between brackets specify the corresponding value of  $x$ . (B,C) Variations of  $\beta$  and  $k_{r,c}$  versus  $x$ , respectively. Error bars in (A–C) refer to dispersions in  $\beta$  and  $k_{r,c}$  values estimated from theoretical recovery of the bioluminescence signals measured at different values of the total Cd concentration in the range 0 to 20 nM.

As argued above,  $k_{r,c}$  increases with increasing light production due to enhanced inhibition of bioluminescence reaction by FMN product. Such an increase in  $\mathcal{L}um_c(t)$  is necessarily connected to an increase in the kinetic constant  $k_{f,c}$  for luciferase production and/or to an increase in the medium carrying capacity  $c_{p,c}^{max}$  (cf. the prefactor in Equation (5)). In turn, using Equation (6) that underpins the dependence  $\beta \propto 1 / (k_{f,c}c_{p,c}^{max})$ , we infer that  $\beta$  should decrease with increasing  $k_{f,c}c_{p,c}^{max}$  or increasing  $k_{r,c}$ , which is in line with the results displayed in Figure 5A. This inverse relationship between  $\beta$  and  $k_{r,c}$  is further illustrated in Figure 5B,C where their respective variations with changing  $x$  are plotted separately. These figures show the existence of a minimum (maximum) for  $k_{r,c}$  ( $\beta$ , respectively) with decreasing  $x$  from 1 to 0.02. This minimum echoes the one observed for  $\mathcal{L}um_{c,max}$  in Figure 2. Again, it is consistent with the idea that bioluminescence reaction inhibition is all the more reduced (with associated decrease in  $k_{r,c}$ ) as light production by cells (and therewith  $\mathcal{L}um_{c,max}$ ) decreases.

### 5. Conclusions

In this work, we report a detailed analysis pointing the differences and similarities between time-resolved bioluminescence signals produced by specific (non-constitutive) Cd-sensing and non-specific (constitutive) *lux*-based whole-cell bacterial sensors in media differing in terms of source and concentration of carbon. Observed differences apply to the overall shape, number, and time occurrence of bioluminescence peaks, to the positioning of signal discontinuities over time, and to the magnitude of the cell response. The peculiar patterns of the constitutive cell signals are here reconstructed on the basis of an original theoretical model that accounts for the finite delay of bioluminescence emission by luciferase, the characteristic timescale for the inhibition of the bioluminescence reaction, the strength of the constitutive promotor (*rrnB* P1 in this study) and the dependence of cell photoactivity on time. This formalism is the counterpart of the one we reported earlier [39] for metal-responsive whole-cell biosensors. In turn, we evidence here how photoactivity of constitutive cells can be retrieved from proper time-deconvolution of normalized bioluminescence signals for a given nutritional quality of the incubation medium.

Despite the different modes of promoter activation for constitutive and non-constitutive cells and the apparent non-similarity of their bioluminescence time-response, the depen-



dence of their cell photoactivities on time as retrieved from theory shares remarkable features. In particular, the bioluminescence signals produced by specific and non-specific biosensors under stringence-controlled conditions both correspond to two successive sigmoidal increases in their photoactivity, reminiscent of well-known biphasic cell growth. We further provide mechanistic connections between local extrema and long-term emission observed in the response of constitutive cells, with on-or-off occurrence of acetate and/or xylose repressions by glucose upon varying glucose-to-xylose concentrations ratio. Similar to metal-responsive cells, these catabolite repressions lead to well-identified discontinuities for the time-dependent rate of variation of photoactivity of constitutive cells over the duration of the bioluminescence assays. Differences between the two biosensing systems refer to the delay of the apparition of these discontinuities and to the non-zero bioluminescence measured at a short time for constitutive cells. This is the result of their finite photoactivity (inherent to the nature of their genetic construction) prior to monitoring their response.

The analysis based on the confrontation between time-resolved bioluminescence measurements and the theory shows that photoactivities of constitutive and metal-responsive *lux*-biosensors depend in a rather similar way on nutritional conditions or, equivalently, on the cell metabolic activity required to sustain light production after promoter activation. This equivalence evidenced between biosensors featuring different promoter actuation mechanisms is basically impossible to sort out from the only inspection of their well-differentiated bioluminescence responses over time. In that respect, the recourse to sound theoretical formalisms for rationalizing signal dependencies on time constitutes an added value to common biosensing practice in environmental and ecotoxicological studies where cell response is often exploited from mere qualitative considerations of the only maximal cell signal amplitude. Future extensions of the here-reported theoretical background may include detailed integrations of transcription-translation processes to model gene regulatory functions and resulting time-dependent concentrations of, e.g., RNA and products from *lux* operon expression. This would surely contribute to increase the biological significance of the here-reported modelling based on the practical use of semi-empirical Hill functions and basic chemical kinetic principles. However, such theoretical efforts should necessarily maintain parsimony in the number of introduced variables to be retrieved from data analysis so as to avoid overparameterization-related issues. The formalism elaborated in this work succeeds in meeting such a compromise while capturing the main properties of the full biosensor's response and changes thereof with modulation of medium nutritional quality.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.P. and J.F.L.D. Methodology, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Software, J.F.L.D.; Validation, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Formal Analysis, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Investigation, E.D., C.P., M.L.Z. and J.F.L.D.; Data Curation, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Writing—Original Draft Preparation, J.F.L.D.; Writing—Review and Editing, E.D., C.P. and J.F.L.D.; Supervision, C.P. and J.F.L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** J.F.L.D. is grateful to French national EC2CO program and OTELo (Observatoire Terre Environnement Lorraine) for financial support: Programs EC2CO MENABIOL and AAP Interdisciplinaire OTELo 2020.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All raw bioluminescence data reported in this work are available upon request, as is the PTC Mathcad Prime code developed for the theoretical analysis of the time-dependent response of constitutive bioluminescent *E. coli* sensors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hillger, J.M.; Schoop, J.; Boomsma, D.I.; Slagboom, P.E.; IJzerman, A.P.; Heitman, L.H. Whole-Cell Biosensor for Label-Free Detection of GPCR-Mediated Drug Responses in Personal Cell Lines. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 233–242. [[CrossRef](#)]
2. Gui, Q.; Lawson, T.; Shan, S.; Yan, L.; Liu, Y. The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. *Sensors* **2017**, *17*, E1623. [[CrossRef](#)]
3. Kylilis, N.; Riangrunroj, P.; Lai, H.-E.; Salema, V.; Fernández, L.Á.; Stan, G.-B.V.; Freemont, P.S.; Polizzi, K.M. Whole-Cell Biosensor with Tunable Limit of Detection Enables Low-Cost Agglutination Assays for Medical Diagnostic Applications. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 370–378. [[CrossRef](#)]
4. Raut, N.; O'Connor, G.; Pasini, P.; Daunert, S. Engineered Cells as Biosensing Systems in Biomedical Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 3147–3159. [[CrossRef](#)]
5. Visaggio, D.; Pirolo, M.; Frangipani, E.; Lucidi, M.; Sorrentino, R.; Mitidieri, E.; Ungaro, F.; Luraghi, A.; Peri, F.; Visca, P. A Highly Sensitive Luminescent Biosensor for the Microvolumetric Detection of the *Pseudomonas Aeruginosa* Siderophore Pyochelin. *ACS Sens.* **2021**, *6*, 3273–3283. [[CrossRef](#)]
6. Zhang, G.; Hu, S.; Jia, X. Highly Sensitive Whole-Cell Biosensor for Cadmium Detection Based on a Negative Feedback Circuit. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 799781. [[CrossRef](#)]
7. Roy, R.; Ray, S.; Chowdhury, A.; Anand, R. Tunable Multiplexed Whole-Cell Biosensors as Environmental Diagnostics for Ppb-Level Detection of Aromatic Pollutants. *ACS Sens.* **2021**, *6*, 1933–1939. [[CrossRef](#)]
8. Wu, Y.; Wang, C.-W.; Wang, D.; Wei, N. A Whole-Cell Biosensor for Point-of-Care Detection of Waterborne Bacterial Pathogens. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10*, 333–344. [[CrossRef](#)]
9. Barger, N.; Oren, I.; Li, X.; Habib, M.; Daniel, R. A Whole-Cell Bacterial Biosensor for Blood Markers Detection in Urine. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10*, 1132–1142. [[CrossRef](#)]
10. Cao, Y.; Zhang, B.; Zhu, Z.; Xin, X.; Wu, H.; Chen, B. Microfluidic Based Whole-Cell Biosensors for Simultaneously On-Site Monitoring of Multiple Environmental Contaminants. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 622108. [[CrossRef](#)]
11. Branco, R.; Cristóvão, A.; Morais, P.V. Highly Sensitive, Highly Specific Whole-Cell Bioreporters for the Detection of Chromate in Environmental Samples. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54005. [[CrossRef](#)]
12. Sørensen, S.J.; Burmølle, M.; Hansen, L.H. Making Bio-Sense of Toxicity: New Developments in Whole-Cell Biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 11–16. [[CrossRef](#)]
13. van der Meer, J.R.; Belkin, S. Where Microbiology Meets Microengineering: Design and Applications of Reporter Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 511–522. [[CrossRef](#)]
14. da Silva Nunes-Halldorson, V.; Duran, N.L. Bioluminescent Bacteria: Lux Genes as Environmental Biosensors. *Braz. J. Microbiol.* **2003**, *34*, 91–96. [[CrossRef](#)]
15. Romero-Freire, A.; Joonas, E.; Muna, M.; Cossu-Leguille, C.; Vignati, D.A.L.; Giamberini, L. Assessment of the Toxic Effects of Mixtures of Three Lanthanides (Ce, Gd, Lu) to Aquatic Biota. *Sci. Total Environ.* **2019**, *661*, 276–284. [[CrossRef](#)]
16. Gupta, N.; Renugopalakrishnan, V.; Liepmann, D.; Paulmurugan, R.; Malhotra, B.D. Cell-Based Biosensors: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *141*, 111435. [[CrossRef](#)]
17. Kessenikh, A.G.; Novoyatlova, U.S.; Bazhenov, S.V.; Stepanova, E.A.; Khrulnova, S.A.; Gnuchikh, E.Y.; Kotova, V.Y.; Kudryavtseva, A.A.; Bermeshev, M.V.; Manukhov, I.V. Constructing of *Bacillus Subtilis*-Based Lux-Biosensors with the Use of Stress-Inducible Promoters. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9571. [[CrossRef](#)]
18. Bereza-Malcolm, L.T.; Mann, G.; Franks, A.E. Environmental Sensing of Heavy Metals through Whole Cell Microbial Biosensors: A Synthetic Biology Approach. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 535–546. [[CrossRef](#)]
19. Jia, X.; Bu, R.; Zhao, T.; Wu, K. Sensitive and Specific Whole-Cell Biosensor for Arsenic Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e00694-19. [[CrossRef](#)]
20. Shah, N.; Naseby, D.C. Bioluminescence-Based Measurement of Viability of *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 9027 Harboring Plasmid-Based Lux Genes under the Control of Constitutive Promoters. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 1373–1387. [[CrossRef](#)]
21. Dalzell, D.J.B.; Alte, S.; Aspichueta, E.; de la Sota, A.; Etxebarria, J.; Gutierrez, M.; Hoffmann, C.C.; Sales, D.; Obst, U.; Christofi, N. A Comparison of Five Rapid Direct Toxicity Assessment Methods to Determine Toxicity of Pollutants to Activated Sludge. *Chemosphere* **2002**, *47*, 535–545. [[CrossRef](#)]
22. Shin, Y.; Qayyum, M.; Pupov, D.; Esyunina, D.; Kulbachinskiy, A.; Murakami, K. Structural Basis of Ribosomal RNA Transcription Regulation. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Duval, J.F.L.; Pagnout, C. Bimodal Stringence-Mediated Response of Metal-Detecting Luminescent Whole Cell Bioreporters: Experimental Evidence and Quantitative Theory. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *309*, 127751. [[CrossRef](#)]
24. Till, P.; Toepel, J.; Bühler, B.; Mach, R.L.; Mach-Aigner, A.R. Regulatory Systems for Gene Expression Control in Cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 1977–1991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, X.; Jiang, X.; Xu, M.; Fang, Y.; Wang, Y.; Sun, G.; Guo, J. Identification of Stress-Responsive Transcription Factors with Protein-Bound *Escherichia Coli* Genomic DNA Libraries. *AMB Express* **2020**, *10*, 199. [[CrossRef](#)]
26. Kotova, V.Y.; Manukhov, I.V.; Zavilgelskii, G.B. Lux-Biosensors for Detection of SOS-Response, Heat Shock, and Oxidative Stress. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2010**, *46*, 781–788. [[CrossRef](#)]
27. Baumstark-Khan, C.; Cioara, K.; Rettberg, P.; Horneck, G. Determination of Geno- and Cytotoxicity of Groundwater and Sediments Using the Recombinant SWITCH Test. *J. Environ. Sci. Health Part A* **2005**, *40*, 245–263. [[CrossRef](#)]

28. Wang, Y.-Z.; Christopher, J.K.; Yong, Y.-C.; Zhai, D.-D. Nutrient Detection with Whole-Cell Biosensors. In *Handbook of Cell Biosensors*; Thouand, G., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2022; pp. 747–766. ISBN 978-3-030-23217-7.
29. Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J.; Slaveykova, V.I.; Wilkinson, K.J. Predicting the Bioavailability of Metals and Metal Complexes: Critical Review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.* **2005**, *2*, 9–24. [[CrossRef](#)]
30. van Leeuwen, H.P. Metal Speciation Dynamics and Bioavailability: Inert and Labile Complexes. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3743–3748. [[CrossRef](#)]
31. Duval, J.F.L.; Rotureau, E. Dynamics of Metal Uptake by Charged Soft Biointerphases: Impacts of Depletion, Internalisation, Adsorption and Excretion. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 7401–7416. [[CrossRef](#)]
32. van Leeuwen, H.P.; Duval, J.F.L.; Pinheiro, J.P.; Blust, R.; Town, R.M. Chemodynamics and Bioavailability of Metal Ion Complexes with Nanoparticles in Aqueous Media. *Environ. Sci. Nano* **2017**, *4*, 2108–2133. [[CrossRef](#)]
33. Duval, J.F.L.; Présent, R.M.; Rotureau, E. Kinetic and Thermodynamic Determinants of Trace Metal Partitioning at Biointerphases: The Role of Intracellular Speciation Dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 30415–30435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Présent, R.M.; Rotureau, E.; Billard, P.; Pagnout, C.; Sohm, B.; Flayac, J.; Gley, R.; Pinheiro, J.P.; Duval, J.F.L. Impact of Intracellular Metallothionein on Metal Biouptake and Partitioning Dynamics at Bacterial Interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 29114–29124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Duval, J.F.L. Coupled Metal Partitioning Dynamics and Toxicodynamics at Biointerfaces: A Theory beyond the Biotic Ligand Model Framework. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 9453–9469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pinheiro, J.P.; van Leeuwen, H.P. Metal Speciation Dynamics and Bioavailability. 2. Radial Diffusion Effects in the Microorganism Range. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 894–900. [[CrossRef](#)]
37. Wilkinson, K.J.; Buffle, J. *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*; Van Leeuwen Herman, P., Koster, W., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2004; Chapter 10.
38. Duval, J.F.L.; Town, R.M.; van Leeuwen, H.P. Lability of Nanoparticulate Metal Complexes at a Macroscopic Metal Responsive (Bio)Interface: Expression and Asymptotic Scaling Laws. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 6052–6065. [[CrossRef](#)]
39. Duval, J.F.L.; Pagnout, C. Decoding the Time-Dependent Response of Bioluminescent Metal-Detecting Whole-Cell Bacterial Sensors. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 1373–1383. [[CrossRef](#)]
40. Delatour, E.; Pagnout, C.; Zaffino, M.; Duval, J.F.L. Exploiting Catabolite Repression and Stringent Response to Control Delay and Multimodality of Bioluminescence Signal by Metal Whole-Cell Biosensors: Interplay between Metal Bioavailability and Nutritional Medium Conditions. *Biosensors* **2022**, *12*, 327. [[CrossRef](#)]
41. Martín-Betancor, K.; Rodea-Palomares, I.; Muñoz-Martín, M.A.; Leganés, F.; Fernández-Piñas, F. Construction of a Self-Luminescent Cyanobacterial Bioreporter That Detects a Broad Range of Bioavailable Heavy Metals in Aquatic Environments. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 186. [[CrossRef](#)]
42. Blanco-Ameijeiras, S.; Cabanes, D.J.E.; Hassler, C.S. Towards the Development of a New Generation of Whole-Cell Bioreporters to Sense Iron Bioavailability in Oceanic Systems—Learning from the Case of *Synechococcus* Sp. PCC7002 Iron Bioreporter. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 1291–1304. [[CrossRef](#)]
43. Käkinen, A.; Bondarenko, O.; Ivask, A.; Kahru, A. The Effect of Composition of Different Ecotoxicological Test Media on Free and Bioavailable Copper from CuSO<sub>4</sub> and CuO Nanoparticles: Comparative Evidence from a Cu-Selective Electrode and a Cu-Biosensor. *Sensors* **2011**, *11*, 10502–10521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Li, B.; Zhang, X.; Tefsen, B.; Wells, M. From Speciation to Toxicity: Using a “Two-in-One” Whole-Cell Bioreporter Approach to Assess Harmful Effects of Cd and Pb. *Water Res.* **2022**, *217*, 118384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, X.; Li, B.; Deng, J.; Qin, B.; Wells, M.; Tefsen, B. Advances in Freshwater Risk Assessment: Improved Accuracy of Dissolved Organic Matter-Metal Speciation Prediction and Rapid Biological Validation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *202*, 110848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Magrisso, S.; Erel, Y.; Belkin, S. Microbial Reporters of Metal Bioavailability: Microbial Reporters of Metal Bioavailability. *Microb. Biotechnol.* **2008**, *1*, 320–330. [[CrossRef](#)]
47. Pinheiro, J.P.; Galceran, J.; van Leeuwen, H.P. Metal Speciation Dynamics and Bioavailability: Bulk Depletion Effects. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 2397–2405. [[CrossRef](#)]
48. Pagnout, C.; Présent, R.M.; Billard, P.; Rotureau, E.; Duval, J.F.L. What Do Luminescent Bacterial Metal-Sensors Probe? Insights from Confrontation between Experiments and Flux-Based Theory. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *270*, 482–491. [[CrossRef](#)]
49. Kelly, C.J.; Hsiung, C.-J.; Lajoie, C.A. Kinetic Analysis of Bacterial Bioluminescence. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 370–378. [[CrossRef](#)]
50. Baba, T.; Ara, T.; Hasegawa, M.; Takai, Y.; Okumura, Y.; Baba, M.; Datsenko, K.A.; Tomita, M.; Wanner, B.L.; Mori, H. Construction of *Escherichia Coli* K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection. *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 2006.0008. [[CrossRef](#)]
51. Pupov, D.; Petushkov, I.; Esyunina, D.; Murakami, K.S.; Kulbachinskiy, A. Region 3.2 of the  $\sigma$  Factor Controls the Stability of RRNA Promoter Complexes and Potentiates Their Repression by DksA. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 11477–11487. [[CrossRef](#)]
52. Ang, J.; Harris, E.; Hussey, B.J.; Kil, R.; McMillen, D.R. Tuning Response Curves for Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 547–567. [[CrossRef](#)]
53. De Paepe, B.; Maertens, J.; Vanholme, B.; De Mey, M. Modularization and Response Curve Engineering of a Naringenin-Responsive Transcriptional Biosensor. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 1303–1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Santillán, M. On the Use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks. *Math. Model. Nat. Phenom.* **2008**, *3*, 85–97. [[CrossRef](#)]
55. Delle Side, D.; Nassisi, V.; Pennetta, C.; Alifano, P.; Di Salvo, M.; Talà, A.; Chechkin, A.; Seno, F.; Trovato, A. Bacterial Bioluminescence Onset and Quenching: A Dynamical Model for a *Quorum Sensing*-Mediated Property. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 171586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Deeva, A.A.; Temlyakova, E.A.; Sorokin, A.A.; Nemtseva, E.V.; Kratasyuk, V.A. Structural Distinctions of Fast and Slow Bacterial Luciferases Revealed by Phylogenetic Analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2016**, *32*, 3053–3057. [[CrossRef](#)]
57. Tjørve, K.M.C.; Tjørve, E. The Use of Gompertz Models in Growth Analyses, and New Gompertz-Model Approach: An Addition to the Unified-Richards Family. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178691. [[CrossRef](#)]
58. Salinitro, M.; Mattarello, G.; Guardigli, G.; Odajiu, M.; Tassoni, A. Induction of Hormesis in Plants by Urban Trace Metal Pollution. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20329. [[CrossRef](#)]
59. Lendenmann, U.; Snozzi, M.; Egli, T. Kinetics of the Simultaneous Utilization of Sugar Mixtures by *Escherichia Coli* in Continuous Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1493–1499. [[CrossRef](#)]
60. Okano, H.; Hermsen, R.; Kochanowski, K.; Hwa, T. Regulation Underlying Hierarchical and Simultaneous Utilization of Carbon Substrates by Flux Sensors in *Escherichia Coli*. *Nat. Microbiol.* **2020**, *5*, 206–215. [[CrossRef](#)]
61. Iqbal, M.; Doherty, N.; Page, A.M.L.; Qazi, S.N.A.; Ajmera, I.; Lund, P.A.; Kypraios, T.; Scott, D.J.; Hill, P.J.; Stekel, D.J. Reconstructing Promoter Activity from Lux Bioluminescent Reporters. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005731. [[CrossRef](#)]

*Chapitre 5 : Détermination des propriétés de biodisponibilité et de spéciation de métaux à partir de l'analyse du signal temporel de bioluminescence de biosenseurs bactériens spécifiques : étude préliminaire*

Dans l'environnement naturel, les métaux sont présents généralement sous plusieurs formes physicochimiques, incluant les ions métalliques libres (hydratés) (M) et les complexes (notés ML) formés avec des molécules, des particules d'origine biologique ou non (*e.g.* microorganismes, acides humiques, particules argileuses), ou des (nano)colloïdes (Buffle, 1988 ; Slaveykova et al., 2005 ; Zhao et al., 2016). La réactivité chimique de ces espèces métalliques influence leurs devenir respectifs dans les milieux naturels, en particulier leurs transports, leurs disponibilités pour les (micro)organismes et leurs toxicités. Au cours des dernières décennies, différents modèles thermodynamiques, en particulier le modèle d'activité des ions libres (FIAM) et le modèle des ligands biotiques (BLM), ont été développés pour décrire la biodisponibilité des métaux dans les systèmes environnementaux (Zhao et al., 2016).

Bien qu'ils aient été extrêmement utiles pour évaluer la biodisponibilité de ces métaux dans différents cas de figure, la littérature fait état de critiques quant aux approximations de ces modèles FIAM et BLM et leurs inapplicabilités dans nombre de situations (Hassler et al., 2004 ; Slaveykova et al., 2005 ; Zhao et al., 2016). En particulier, ces modèles font l'hypothèse d'un équilibre systématique entre concentrations des espèces métalliques libres (et complexées) à la surface biologique accumulatrice et dans le bulk de la solution. Par ailleurs, ils ne tiennent pas compte du rôle possible joué par le processus de dissociation des complexes dans l'établissement du flux d'internalisation de l'élément métallique. Aussi, ils ignorent la possible déplétion du métal dans le milieu au cours du temps, laquelle déplétion conduit nécessairement à une diminution de la biodisponibilité du métal pendant le processus même de bioaccumulation. (Hassler et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Slaveykova et al., 2005; Duval & Rotureau, 2014; Zhao et al., 2016). Pour pallier ces différentes limitations de ces modèles thermodynamiques, des formalismes théoriques décrivant la dynamique de spéciation et bioaccumulation des métaux ont été élaborés. Ces formalismes permettent d'estimer la labilité des complexes, *i.e.* leur capacité à se dissocier et à contribuer au flux d'internalisation des métaux libres (en considérant que ces métaux libres sont les seules espèces bioaccumulables). Ils permettent ainsi d'explorer les scénarios de spéciation hors-équilibre et de bioaccumulation associée (non prédite par BLM), et ce en tenant compte des couplages entre flux de diffusion ( $J_{diff}$ ) des métaux libres (M) et complexés (ML) depuis la solution jusqu'à la surface bioaccumulatrice, le flux de dissociation des complexes ( $J_{kin}$ ) au niveau de la couche dite de réaction (concept de 'reaction layer'), le flux d'internalisation de métal ( $J_{int}$ ) et les échelles de temps relatives à ces différents processus (van Leeuwen, 1999; van Leeuwen et al., 2005). D'autres études se sont attachées à formaliser ces différents processus extracellulaires et biointerfaciaux en examinant les effets électrostatiques dus aux charges des chélateurs des métaux et aux charges des surfaces bioaccumulatrices (Duval et al., 2023), en différenciant formellement les cinétiques (très différentes) de formation et de dissociation des complexes moléculaires et particulaires, en tenant compte des effets de complexation intracellulaire du métal qui participe aussi à la dynamique de partition des espèces métalliques à l'interface

microorganisme/solution, ou encore en évaluant l'influence des processus d'excrétion des métaux par les microorganismes et de déplétion du métal au cours du temps (**Pinheiro et al., 2004; Duval, 2013; Duval & Rotureau, 2014; Rotureau et al., 2015; Duval et al., 2016; Présent et al., 2017**).

Parallèlement à ces différents développements théoriques, le design de biosenseurs bactériens luminescents pour la détection de métaux s'est révélé être une solution prometteuse pour évaluer la biodisponibilité de ces métaux en solution. Cependant, une telle évaluation à partir de l'analyse mécaniste de la réponse temporelle de bioluminescence de ces biosenseurs demeure très difficile car elle requiert l'intégration des différents processus physicochimiques qui gouvernent la distribution des différentes espèces métalliques à l'interface biosenseur/solution aqueuse. Aussi, cette analyse nécessite de déconvoluer/identifier proprement les contributions de ces processus physicochimiques et les contributions qui sont liées au métabolisme cellulaire des nutriments du milieu, lesquelles sont requises pour la production de bioluminescence après activation du promoteur. Les travaux de décryptage/décodage du signal de bioluminescence par **Duval & Pagnout, (2019, 2020)** et plus récemment ceux décrits dans cette thèse (**Chapitres 3 et 4**) ont permis d'établir un formalisme expliquant les liens complexes entre qualité nutritive du milieu (ce qui inclut la biodisponibilité des nutriments) et évolution de la bioluminescence dans le temps. En particulier, ces travaux ont montré comment la multimodalité du signal, la troncature des pics de bioluminescence ou encore l'apparition de doublets de pics étaient des marqueurs très fin (résolus dans le temps) de changements d'activité cellulaire qui font suite à des situations évolutives de carences nutritives.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons spécifiquement à analyser comment les facteurs biophysicochimiques qui contrôlent la spéciation et la bioaccumulation de métaux sont reflétés dans les signaux temporels de bioluminescence. Pour ce faire, nous nous appuyons sur le cadre théorique présenté en **Annexe** (p. 166) qui établit un lien formel entre réponse temporelle de bioluminescence, dynamique des processus qui déterminent les distributions spatio-temporelles d'un métal et de sa forme complexée à l'interface biosenseur/solution, et la bioaccumulation du métal libre (internalisable), et ce en tenant compte de la possible déplétion du métal (libre) en solution au cours du temps (mais en négligeant les interactions électrostatiques biosenseur/métal/ligands). Le lecteur est invité à se reporter à l'**Annexe** pour les détails. L'objectif de ce chapitre est donc de confirmer (ou non) si les prédictions théoriques avancées dans **Duval et al.** (cf. **Annexe** p. 166) quant aux effets des concentrations en biosenseurs et en ligands (moléculaires ou particuliers) sur le signal de bioluminescence concordent qualitativement avec les résultats expérimentaux.

Pour cette étude, de nombreux essais de bioluminescence ont été réalisés pour une concentration initiale totale en Cd de 16 nM (ca. 70% de forme libre dans le bulk de la solution, selon des calculs par Visual MINTEQ) en faisant varier systématiquement les concentrations en biosenseurs (*Escherichia*

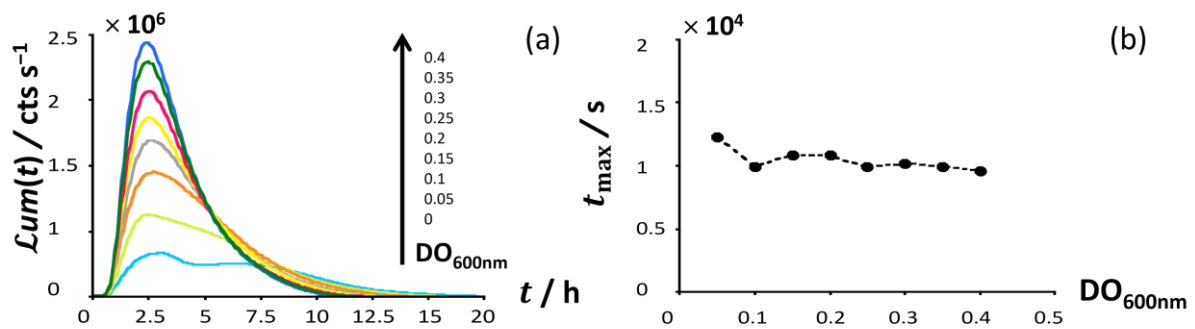
*coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II)) et les concentrations en ligands moléculaires ou particuliers listés dans les Tableaux IV et V du **Chapitre 2**. Pour les ligands moléculaires, les essais ont été conduits dans des milieux ‘haute et basse salinité’ afin d’évaluer également les effets électrostatiques sur le signal des biosenseurs. Pour les ligands particuliers, les essais ont été réalisés dans des milieux ‘basse salinité’ uniquement et ce afin de s’assurer de la stabilité colloïdale des suspensions (stabilité contre les processus d’agrégation). Des données de diffusion de la lumière (DLS, cf. **Chapitre 2**) ont confirmé l’absence d’agrégation des ligands particuliers dans les conditions des essais de bioluminescence. Dans ce **Chapitre 5**, nous sélectionnons quelques résultats illustratifs de ces essais de bioluminescence et une analyse approfondie de tous les résultats obtenus dans cette thèse sera effectuée ultérieurement. Nous rappelons que toutes les conditions testées dans ce Chapitre correspondent à des situations de non-toxicité des métaux et des ligands pour les biosenseurs. Ceci a été vérifié par mesure des réponses de bioluminescence de biosenseurs constitutifs (*rrnB P1-luxCDABE E. coli*) dans les mêmes conditions que celles adoptées pour les biosenseurs sensibles au Cd(II).

La récente théorie de **Duval et al.** (cf. **Annexe**) précise comment la concentration cellulaire et la concentration en ligands (ainsi que la nature du ligand, i.e. ligand faible versus ligand fort) influencent le signal temporel de bioluminescence. Nous rappelons brièvement ci-dessous les conclusions importantes de l’**Annexe** qui s’y rapportent. Une augmentation de la concentration en biosenseurs (dans des conditions réalistes/pratiques de mesure) génère une augmentation du signal (nous considérons ici un signal monomodal par souci de simplicité) et une possible apparition des maximas de bioluminescence qui est déplacée vers des temps courts dans le cas d’une déplétion significative du métal au cours du temps. Une augmentation de la concentration en ligands génère, quant à elle, une diminution de la bioluminescence en raison de la complexation de la forme métallique libre internalisable et un possible shift des maximas de bioluminescence vers des temps longs dans le cas d’une déplétion significative du métal au cours du temps. Le lecteur est invité à se référer à l’**Annexe** pour une analyse détaillée des mécanismes à l’origine de ces modulations du signal. Nous nous contentons de préciser ici que les variations des signaux évoquées ci-dessus sont générées par le couplage entre cinétique d’éveil de la photoactivité cellulaire et cinétique de déplétion des métaux en solution au cours du temps. Ce couplage reflète pour partie les déterminants thermodynamiques et cinétiques de la spéciation du métal et de sa bioaccumulation. Par ailleurs, selon la théorie de **Duval et al.**, (2023) (cf. **Annexe** p. 166) l’augmentation de la concentration bactérienne au-delà d’une valeur seuil entraîne une diminution de la bioluminescence en raison des effets alors dominants de déplétion du métal dans le milieu au cours du temps.



## 1. Effet de la concentration en biosenseurs sur le signal de bioluminescence en l'absence de ligands

La **Fig. 1** présente la réponse temporelle des biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) à différentes densités optiques (0.05-0.4) en présence d'une concentration totale en Cd de 16 nM, en l'absence de ligands moléculaires ou particuliers (**Fig. 1a**), ainsi que la position temporelle des  $t_{max}$  en fonction de la densité optique (**Fig. 1b**). Ces résultats montrent une augmentation de la luminescence avec l'augmentation de la densité optique sans aucun décalage temporel des pics de luminescence maximale ( $Lum_{max}$ ) (**Fig. 1a**), absence de décalage également visible sur la **Fig. 1b**. Dans ce cas précis, cette absence de shift traduit une situation où la cinétique de déplétion des métaux en solution est soit très lente ou très rapide par rapport à la cinétique d'éveil de la photoactivité cellulaire, i.e.  $\tau_{depl}/\tau_{biol} \ll 1$  ou  $\tau_{depl}/\tau_{biol} \gg 1$ , respectivement, avec  $\tau_{biol}$ , un temps caractéristique associé à l'éveil de la photoactivité cellulaire et  $\tau_{depl}$ , le temps caractéristique associé à la déplétion des métaux dans le milieu (cf. Figure 5D dans l'Annexe p. 166).

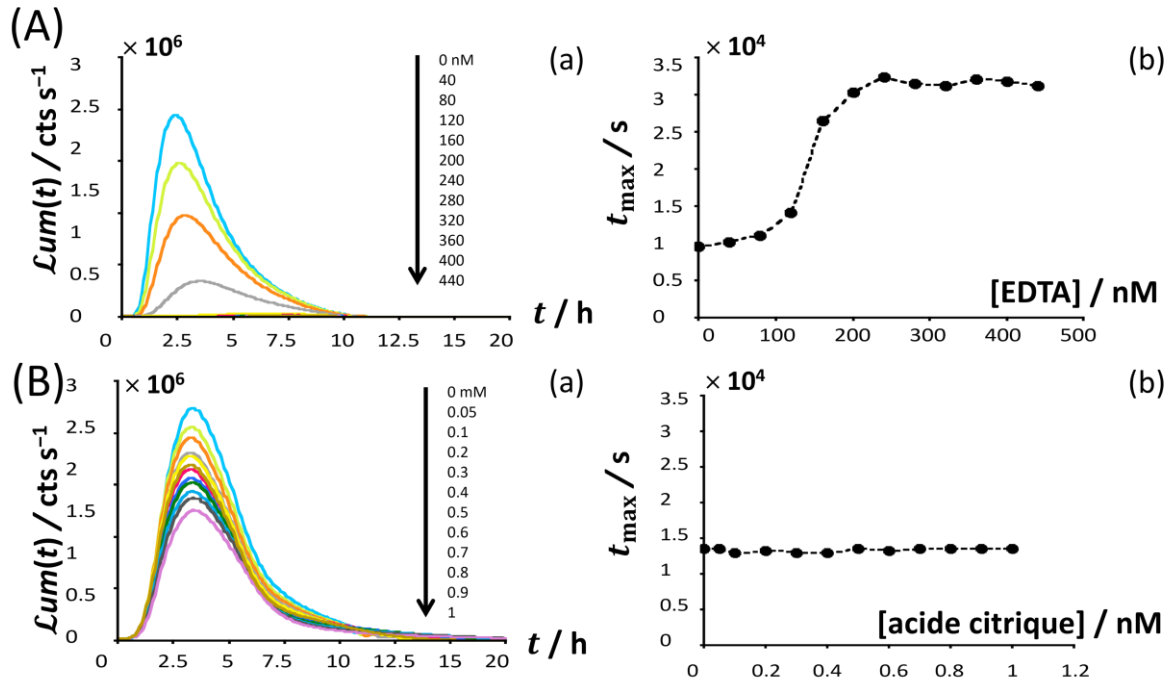


**Fig. 1** : Dépendance temporelle de la bioluminescence ( $Lum(t)$  en nombre de coups par seconde) produite par les biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) en fonction de la densité optique ( $DO_{600nm} = 0.05-0.4$ ) et en l'absence de ligands autre que ceux du milieu utilisé pour le bio-essai. Les mesures sont rapportées pour une concentration totale de Cd(II) de 16 nM. (b) Position temporelle des intensités maximales des pics de bioluminescence ( $t_{max}$ ) en fonction de la densité optique.

## 2. Effet de la concentration en ligands sur le signal de bioluminescence – Cas des ligands moléculaires (expériences ‘basse salinité’)

Théoriquement, l'ajout de ligands dans le milieu engendre une diminution plus ou moins importante des signaux de bioluminescence. Cette diminution est due à la complexation des métaux avec les ligands, et l'amplitude de cette diminution de l'intensité du signal dépend de plusieurs facteurs, notamment de la constante de stabilité des complexes formés entre les métaux et les ligands, de la concentration en ligands présents et des effets plus ou moins importants de déplétion du métal en solution (cf. **Annexe**). Plus la constante de stabilité du complexe est élevée, plus l'intensité du signal chute : c'est une des conséquences (triviales) du processus de complexation, lequel diminue la

biodisponibilité du métal libre internalisable. De façon plus intéressante et remarquable, les ligands vont générer un effet tampon de la concentration en métal libre en solution (loin de l'interface bioaccumulatrice), ce qui a pour conséquence de retarder le processus de déplétion lorsqu'on augmente la concentration en ligands ou lorsque l'on passe (à une concentration donnée) d'un ligand faible à un ligand fort (cf. **Annexe**). Ainsi, si la concentration en biosenseurs est suffisamment élevée pour induire une déplétion des métaux, une augmentation de la concentration en ligands va alors générer un retard de cette déplétion par rapport à l'éveil de la photoactivité cellulaire. Ceci se traduit par un ratio croissant  $\tau_{\text{depl}}/\tau_{\text{biol}}$  et donc par un décalage de l'apparition des pics de bioluminescence vers des temps longs. Ce décalage temporel est d'autant plus significatif que l'effet tampon est important, c'est-à-dire que les ligands sont forts. Ces effets prévus par la théorie sont en accord qualitatif avec les données expérimentales collectées avec l'EDTA (ligand fort ayant un  $\log(K \text{ en mol}^{-1}\text{m}^3) = 18.1$ , **fig. 2A-a,b**) et l'acide citrique (ligand plus faible,  $\log(K \text{ en mol}^{-1}\text{m}^3) = 4.98$  pour le complexe monodentate, **fig. 2B-a,b**). Pour ce dernier type de ligand, aucun décalage temporel des signaux n'est observé, ce qui traduit l'absence de déplétion du métal en solution *pendant* la phase d'éveil du biosenseur, i.e. il n'y a pas de *crosstalk* entre les cinétiques de déplétion et d'éveil de la photoactivité cellulaire. Pour des concentrations suffisamment élevées en EDTA (signaux très faibles,  $[\text{EDTA}] > 200 \text{ nM}$ ), la position du pic de bioluminescence (i.e.  $t_{\text{max}}$ ) demeure invariante avec l'ajout d'EDTA (cf. **Fig 2A-b**). L'existence de ce plateau dans l'évolution de  $t_{\text{max}}$  avec la concentration en ligands est également en accord avec les prédictions théoriques (cf. insert de la **Fig. 7B** en **Annexe**, p. 166).

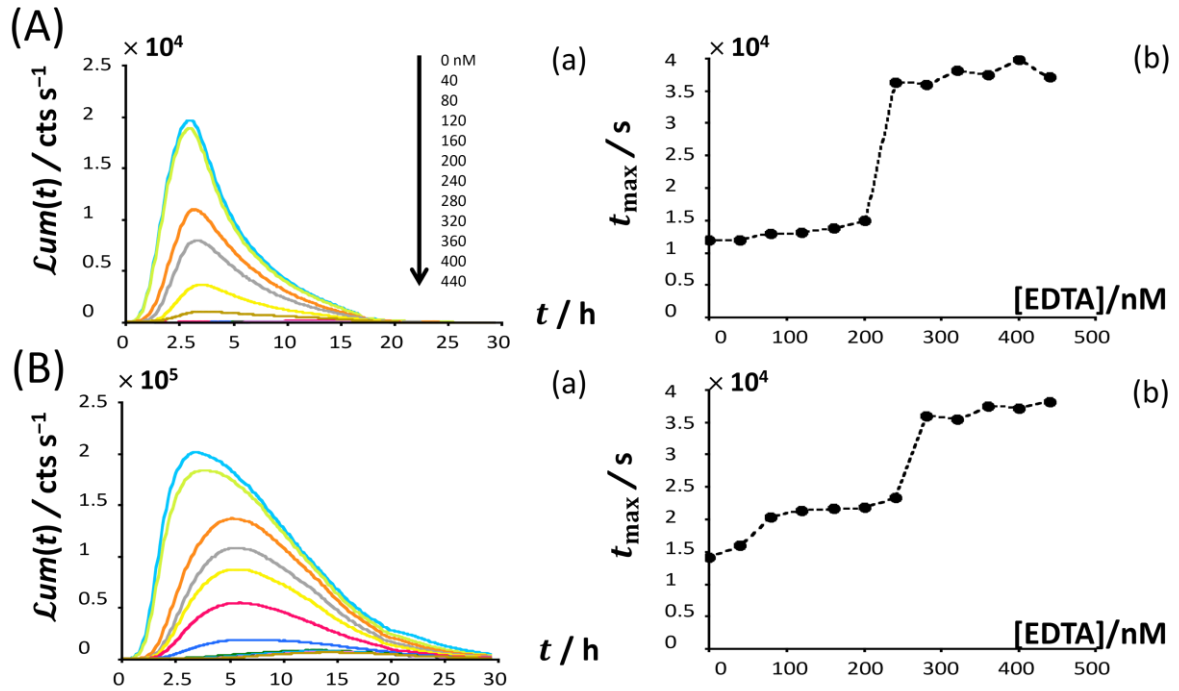


**Fig. 2 :** Dépendance temporelle de la bioluminescence ( $Lum(t)$  en nombre de coups par seconde) produite par les biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) en fonction de la concentration (spécifiée) et du type de ligands à densité optique fixe ( $DO_{600\text{nm}} = 0.4$ ). Les mesures sont rapportées pour une concentration totale de Cd de 16 nM. (b) Position temporelle des intensités maximales des pics de bioluminescence ( $t_{\text{max}}$ ) en fonction de la concentration en ligands. Les panneaux A et B font référence aux ligands moléculaires testés avec (A) EDTA, (B) acide citrique.

### 3. Effet de l'électrostatique sur le signal temporel de bioluminescence – Cas des ligands moléculaires

La **Fig. 3** présente la réponse temporelle des biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) obtenue pour une densité optique à 600 nm de 0,4 en présence d'une concentration totale en Cd de 16 nM et du ligand moléculaire EDTA dont on a aussi fait varier la concentration. Les figures détaillent ces réponses pour les conditions salines différentes qualifiées 'basse et haute salinité' et qui correspondent à une concentration équivalente en  $\text{NaNO}_3$  de 10 et 200 mM, respectivement. Qualitativement, les variations des intensités maximales de bioluminescence et de la position des pics, lorsqu'on augmente la concentration en EDTA, restent similaires à celles indiquées et expliquées en **Fig. 2A**, quel que soit la salinité du milieu (i.e. diminution de l'intensité maximale des pics et décalage de leur position vers des temps plus longs). Quantitativement, des différences entre les profils des signaux de bioluminescence mesurés pour les deux conditions salines d'intérêt sont observables. En effet, les signaux présentent une intensité maximale de bioluminescence un peu moins élevée et une réponse temporelle moins étalée dans le temps pour la condition 'basse salinité' à 10 mM (**Fig. 3A-a**) par comparaison à la condition 'haute salinité' à 200 mM (**Fig. 3B-a**). A ce stade de l'analyse, plusieurs processus impliqués dans la production de photons peuvent être impactés par la salinité du milieu. En

particulier, pour ce qui est des processus physicochimiques extracellulaires contribuant à la réponse des biosenseurs (à savoir la spéciation, le transport et la déplétion des métaux en solution), on pourrait s'attendre à ce que, au premier ordre, les interactions électrostatiques attractives entre surface cellulaire et métaux en solution aillent dans le sens d'une réponse plus importante du biosenseur. Cette intuition n'est pas en accord avec les données d'intensité maximale des signaux telles que reportées en **Figs. 3A,B-a**. Ainsi, il apparaît que les variations des signaux mesurées versus la salinité du milieu soient plus à mettre en relation avec les changements correspondants de l'activité métabolique des biosenseurs, rappelant ici que modifier la salinité génère un stress (osmotique) pour les biosenseurs bactériens. Cet effet se répercute alors sur la dépendance temporelle de la photoactivité cellulaire qui intervient dans le produit de convolution définissant la variation de la bioluminescence en fonction du temps (cf. eq. 39 dans l'**Annexe**). Ceci explique, qualitativement, pourquoi un changement de salinité peut générer des modifications en termes d'amplitude, de forme et de position de pics. Evidemment, ces conclusions seront à affiner lors du traitement quantitatif des données sur la base du formalisme présenté en **Annexe** après y avoir intégré la composante électrostatique des interactions cellule/métaux/ligands. Cette composante peut impacter non seulement la photoactivité cellulaire (cf. plus haut) mais aussi la labilité et biodisponibilité des complexes métalliques (**Duval et al., (2023)**).



**Fig. 3 :** (a) Dépendance temporelle de la bioluminescence ( $Lum(t)$  en nombre de coups par seconde) produite par les biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) en fonction de la concentration (spécifiée) en ligands moléculaires (*i.e.* EDTA) et une densité optique  $DO_{600nm} = 0.4$ . Les mesures sont rapportées pour une concentration totale de Cd de 16 nM. (b) Position temporelle des intensités maximales des pics de bioluminescence ( $t_{max}$ ) en fonction de la concentration en EDTA. Les panneaux A et B font référence aux différentes conditions salines testées avec (A) condition saline à 10 mM, (B) condition saline à 200 mM.

#### 4. Effet de la concentration en ligands sur le signal de bioluminescence – Cas des ligands particuliers

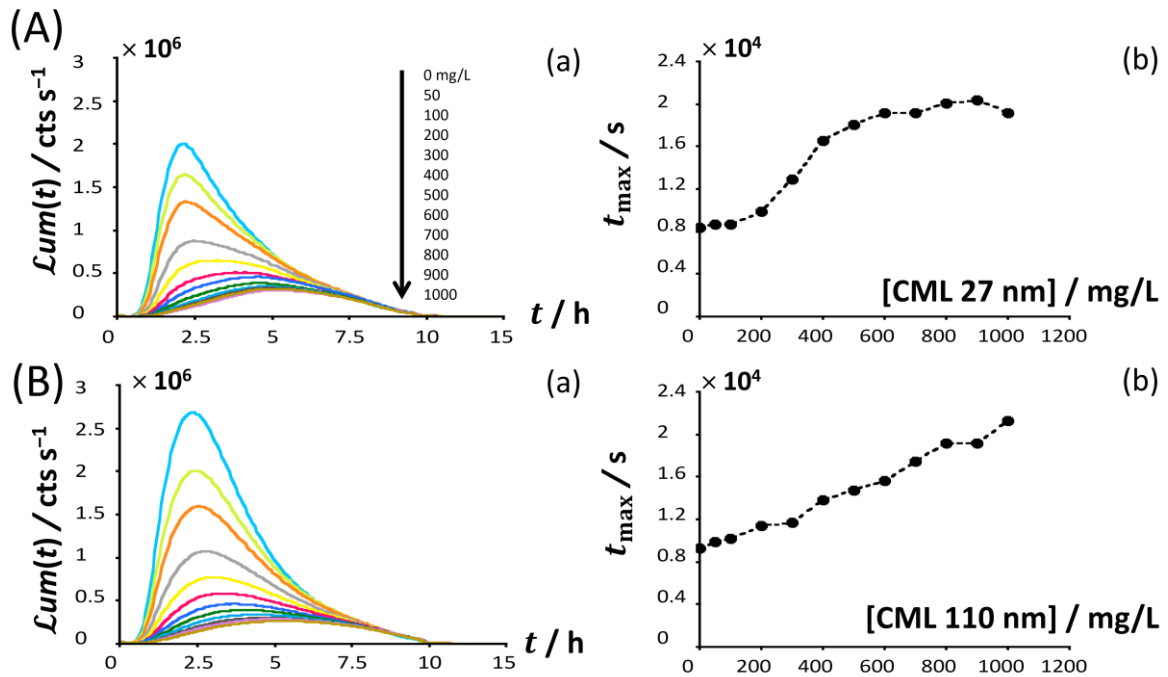
La **Fig. 4** présente la réponse temporelle des biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) pour une densité optique donnée ( $DO_{600nm} = 0,4$ ) et une concentration totale en Cd de 16 nM en présence de ligands particuliers (particules de latex carboxylées, acronyme CML) de tailles différentes (27, 37, 60 et 110 nm de diamètre) et dont on a fait varier la concentration. Par choix, nous présentons ici les résultats obtenus avec les particules de diamètre 27 nm et 110 nm. Ces résultats montrent que l'ajout de ligands particuliers conduit à une diminution plus ou moins importante de la réponse temporelle de bioluminescence selon la taille du ligand. En effet, les signaux temporels obtenus en présence de ligands particuliers de petite taille (**Fig. 4A-a**) mettent en évidence une diminution d'un facteur 6.2 de la bioluminescence sur la gamme de concentration testée (0-1000 mg/L), diminution qui est moins importante que celle mesurée en présence de ligands particuliers de plus grande taille (diminution d'un facteur 10.1), comme illustré en **Fig. 4B-a**. En outre, la diminution de la bioluminescence est très marquée pour des concentrations en ligands de 0 à 600 mg/L (facteur de diminution de 5.1 et 6.8 pour les CML 27 nm et 110 nm, respectivement) et cette diminution devient

moins prononcée pour des concentrations de 600 à 1000 mg/L (facteurs ca. 1.2 et 1.5 pour les CML 27 nm et 110 nm, respectivement). Ces tendances sont en accord qualitatif avec la décroissance asymptotique de la bioluminescence prédite à haute concentration en ligand par la théorie en **Annexe** (cf. l'insert de la Figure 7C en **Annexe**).

La constante de stabilité des complexes particules-Cd est plus importante pour les ligands particuliers de plus grande taille (*i.e.* CML 110 nm) (*i.e.*  $\log(K) = 2.24$ ) que pour les CML 27 nm (*i.e.*  $\log(K) = 1.95$ , cf. données dans le **Tableau V** du **Chapitre 2**). Cette complexation plus importante pour les ligands de grande taille, conjointement à leur surface plus grande, va donc engendrer une diminution d'autant plus significative de la concentration en métal libre (forme internalisable) : ceci se reflète dans la chute du signal de bioluminescence, chute qui est plus marquée avec les ligands de plus grande taille.

Concernant la dépendance temporelle du signal, pour les deux ligands particuliers sélectionnés nous observons un décalage aux temps longs des pics de bioluminescence en augmentant la concentration en ligands (**Figs. 4A-b et 4B-b**). Cette tendance, également observée pour les ligands moléculaires (cf. **Figs. 2-3**), est qualitativement conforme aux attendus théoriques (cf. **Annexe**). Cependant, les considérations triviales mentionnées ci-dessus relatives aux différences de  $\log(K)$  et de surface pour les deux ligands particuliers choisis, ne peuvent pas expliquer les différences de croissance des  $t_{\max}$  avec la concentration en ligands particuliers de diamètre 27 nm et 110 nm (**Figs. 4A-b et 4B-b**, respectivement). En effet, cette croissance des  $t_{\max}$  pour les ligands CML 110 nm est plus graduelle/progressive que celle mesurée avec les CML 27 nm. A ce stade préliminaire de l'analyse qui sera, encore une fois, peaufinée lors de la reconstruction théorique ultérieure des signaux, nous anticipons que cette différence de comportement des  $t_{\max}$  est connectée, au moins *pour partie*, aux différences de labilité des complexes Cd-ligands. Au premier ordre et en omettant de notre raisonnement les effets électrostatiques liés aux charges de la surface bactérienne (par souci de simplicité), nous pouvons dire que les complexes Cd-CML de taille 27 nm sont plus labiles que les complexes de taille 110 nm en raison de leur exclusion (stérique) moins importante de la couche réactionnelle située à l'interface biosenseur/solution (**Duval et al., 2017, 2018**). Ainsi, au regard des relations mises en évidence en **Annexe** entre labilité des complexes et cinétique de déplétion des métaux en solution (à savoir : plus un complexe est labile, plus rapide est la déplétion du métal libre en solution, cf. Figure 3A en **Annexe**), nous pouvons anticiper que les ligands particuliers de plus grande taille vont générer des cinétiques plus lentes de déplétion des métaux libres (non complexés) en solution. En d'autres termes, plus la taille du ligand augmente, plus on s'attend à ce que le ratio  $\tau_{\text{depl}}/\tau_{\text{biol}}$  augmente, et cette augmentation est d'autant plus importante que la concentration en ligand augmente elle aussi. Ainsi, moduler la taille des ligands n'est pas sans conséquence en termes d'amplitude du couplage entre cinétique de déplétion du métal en solution et cinétique d'éveil de la photoactivité cellulaire : ceci se

traduit par des évolutions différentes des  $t_{\max}$  versus la concentration en ligands particulaires. Des interprétations plus fines de ces évolutions émergeront lors de l'analyse quantitative des signaux.



**Fig. 4 :** (a) Dépendance temporelle de la bioluminescence ( $Lum(t)$  en nombre de coups par seconde) produite par les biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II) en fonction de la concentration et de la taille du ligand particulaire pour une densité optique  $DO_{600nm} = 0.4$ . Les mesures sont rapportées pour une concentration totale de Cd de 16 nM. (b) Position temporelle des intensités maximales des pics de bioluminescence ( $t_{\max}$ ) en fonction de la concentration en ligands particulaires. Les panneaux A et B font référence aux ligands particuliers testés avec (A) CML 27 nm, (B) CML 110 nm.

## 5. Conclusions

En conclusion de cette première analyse rapide, nous démontrons que les données expérimentales collectées sur des biosenseurs sensibles au Cd affichent des patrons d'évolution temporelle versus la concentration cellulaire et la concentration en ligands (*i.e.* chélateurs du Cd) qui sont en accord qualitatif avec le formalisme théorique détaillé en **Annexe**. Nous montrons en particulier que non seulement les informations relatives à la dépendance des maximas de bioluminescence sont importantes pour une évaluation de la biodisponibilité des métaux, mais aussi celles qui se rapportent à la position de ces maximas dans le temps. En effet, l'existence de décalage de ces positions lorsque l'on varie les concentrations en biosenseurs et/ou ligands est une signature de l'occurrence de déplétion des métaux en solution pendant leur bioaccumulation par les biosenseurs. Evidemment, cette déplétion perturbe complètement la dynamique de partition des métaux à l'interface biosenseur/solution et, de par là-même, leur biodisponibilité. Nous envisageons d'utiliser cette propriété remarquable des signaux des biosenseurs luminescents pour quantifier, au moyen du formalisme théorique donné en **Annexe** et de ses extensions à venir (cf. détails ci-dessous), les facteurs thermodynamiques *et* cinétiques contrôlant la spéciation et la bioaccumulation des métaux. Les extensions du formalisme porteront sur le cas des ligands moléculaires et particulaires en incluant les effets électrostatiques dont on sait qu'ils ont un effet important sur les propriétés chémodynamiques des complexes métaux-particules ainsi que sur leur labilité (Duval, 2017; Duval et al., 2017, 2018). Dans le cas de ligands particulaires, les propriétés électrostatiques de ces ligands ainsi que leur taille, mesurées par électrophorèse et diffusion de la lumière respectivement, seront prises en compte dans le formalisme.



### Références bibliographiques:

- Duval, J. F. L. (2013). Dynamics of metal uptake by charged biointerphases : Bioavailability and bulk depletion. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(20), 7873-7888.
- Duval, J. F. L. (2017). Chemodynamics of metal ion complexation by charged nanoparticles : A dimensionless rationale for soft, core-shell and hard particle types. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(19), 11802-11815.
- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2019). Decoding the Time-Dependent Response of Bioluminescent Metal-Detecting Whole-Cell Bacterial Sensors. *ACS Sensors*, 4(5), 1373-1383.
- Duval, J. F. L., & Pagnout, C. (2020). Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent whole cell bioreporters : experimental evidence and quantitative theory. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127751.
- Duval, J. F. L., Présent, R. M., & Rotureau, E. (2016). Kinetic and thermodynamic determinants of trace metal partitioning at biointerphases : The role of intracellular speciation dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(44), 30415-30435.
- Duval, J. F. L., & Rotureau, E. (2014). Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases : Impacts of depletion, internalisation, adsorption and excretion. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16(16), 7401-7416.
- Duval, J. F. L., Town, R. M., & van Leeuwen, H. P. (2017). Applicability of the Reaction Layer Principle to Nanoparticulate Metal Complexes at a Macroscopic Reactive (Bio)Interface : A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(35), 19147-19161.
- Duval, J. F. L., Town, R. M., & van Leeuwen, H. P. (2018). Lability of nanoparticulate metal complexes at a macroscopic metal responsive (bio)interface : expression and asymptotic scaling laws. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(11), 6052-6065.
- Duval, J. F. L., van Leeuwen, H. P., & Town, R. M. (2023). Electrostatic effects on ligand-assisted transfer of metals to (bio)accumulating interfaces and metal complexes (bio)availability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 658, 130679.
- Hassler, C. S., Slaveykova, V. I., & Wilkinson, K. J. (2004). Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(2), 283-291.
- Pinheiro, J. P., Galceran, J., & Van Leeuwen, H. P. (2004). Metal speciation dynamics and bioavailability : bulk depletion effects. *Environmental Science & Technology*, 38(8), 2397-2405.
- Présent, R. M., Rotureau, E., Billard, P., Pagnout, C., Sohm, B., Flayac, J., Gley, R., Pinheiro, J. P., & Duval, J. F. L. (2017). Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(43), 29114-29124.
- Rotureau, E., Billard, P., & Duval, J. F. L. (2015). Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal depletion kinetics at various cell concentrations : theory and application. *Environmental Science & Technology*, 49(2), 990-998.

- Slaveykova, V. I., Wilkinson, K. J., Slaveykova, V. I., & Wilkinson, K. J. (2005). Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: critical review of the Biotic Ligand Model. *Environmental Chemistry*, 2(1), 9-24.
- van Leeuwen, H. P. (1999). Metal Speciation Dynamics and Bioavailability: Inert and Labile Complexes. *Environmental Science & Technology*, 33(21), 3743-3748.
- van Leeuwen, H. P., Town, R. M., Buffle, J., Cleven, R. F. M. J., Davison, W., Puy, J., van Riemsdijk, W. H., & Sigg, L. (2005). Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 39(22), 8545-8556.
- Zhao, C.-M., Campbell, P. G. C., & Wilkinson, K. J. (2016). When are metal complexes bioavailable? *Environmental Chemistry*, 13(3), 425.

*Annexe relative au Chapitre 5 -  
Biophysicochemical kinetics of metal  
detection by luminescence-based  
whole-cell biosensors: connecting  
biosensor response to metal  
bioavailability, speciation and cell  
metabolism*

Cette Annexe a fait l'objet du manuscrit suivant soumis pour publication dans *Physical Chemistry Chemical Physics* :

Biophysicochemical kinetics of metal detection by bioluminescence-based whole-cell biosensors: connecting biosensor response to metal bioavailability, speciation and cell metabolism. Duval, J.F.L.; Maffei, L.; Delatour, E.; Zaffino, M. and Pagnout, C. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Accepté pour publication avec révisions mineures (statut de l'article au moment du dépôt du manuscrit de thèse).

1 **Biophysicochemical kinetics of metal detection by luminescence-based whole-cell biosensors:**  
 2 **connecting biosensor response to metal bioavailability, speciation and cell metabolism**

3  
 4 Jérôme F.L. Duval,<sup>1,\*</sup> Lorenzo Maffei,<sup>2</sup> Eva Delatour,<sup>2</sup> Marie Zaffino,<sup>2</sup> Christophe Pagnout<sup>2</sup>

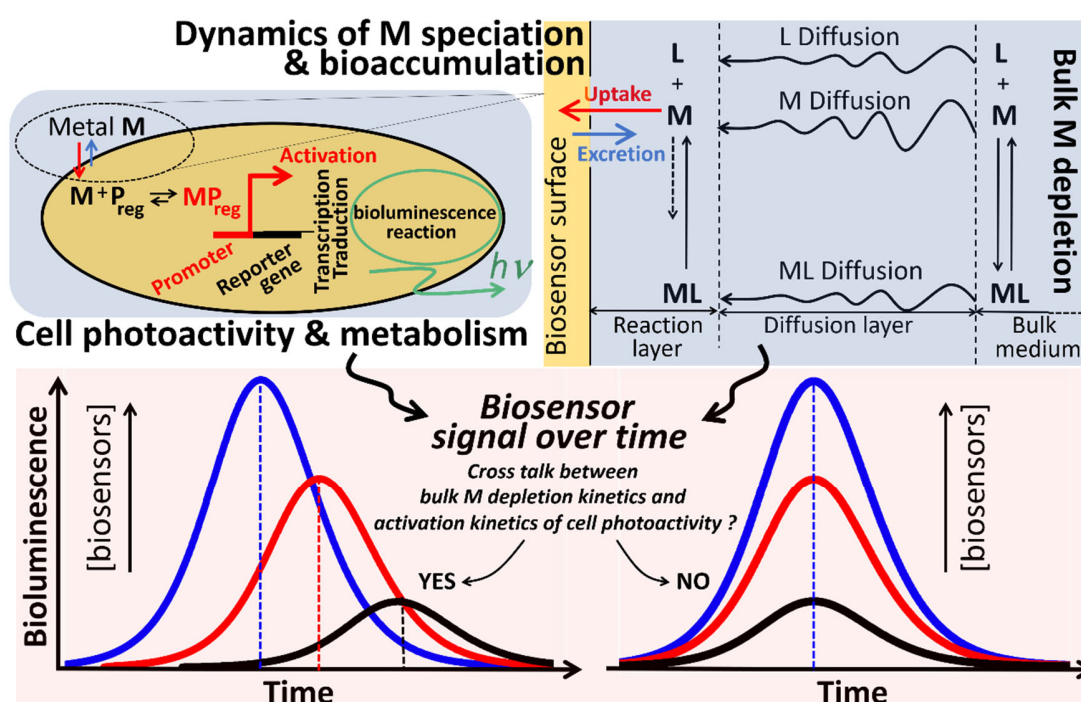
5  
 6 <sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, France.

7 <sup>2</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France.

8 \* Corresponding author (jerome.duval@univ-lorraine.fr).

9  
 10

**GRAPHICAL ABSTRACT.**



11 **Keywords.** Bioluminescence, Whole-cell metal bioreporters, Metal bioavailability, Metal speciation,  
 12 Biointerfacial metal partitioning, Biophysicochemical theory.

13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18

19 **Abstract.**

20 Luminescent whole-cell metal biosensors are genetically engineered cells used for the detection of metals  
21 in e.g. aqueous solutions. Herein, we detail the quantitative connections between time-response of  
22 luminescent bacterial metal sensors and the bioavailability of free and complexed metal species. To that  
23 end, we formulate the biophysicochemical dynamics of metal partitioning at a biosensor/solution  
24 interface and integrate the required metabolism contribution to cell response. The formalism explains the  
25 ways in which cell signal depends on: coupled Eigen kinetics of metal complexation and diffusion of metal  
26 species to/from the interface; kinetics of metal excretion, Michaelis-Menten bioaccumulation and ensuing  
27 metal depletion from bulk solution; and kinetics of bioluminescence production following intracellular  
28 metal sequestration by regulatory metalloproteins. In turn, an expression is derived for the time-  
29 dependent cell signal as a function of interrelated (bioavail)ability of metal species and (thermo)dynamic  
30 descriptors of extra/intracellular metal complexation. Quantitative criteria are elaborated to identify  
31 scenarios where equilibrium modeling of metal speciation is incorrect, bulk metal depletion is operative,  
32 metal biouptake kinetics is governed by metal diffusion, or labile metal complexes fully contribute to cell  
33 response. Remarkably, in agreement with experiments, the theory predicts time-shifts of  
34 bioluminescence peaks with increasing concentration of biosensor and/or metal ligand in solution. We  
35 show that these shifts originate from the crosstalk between activation kinetics of cell photoactivity and  
36 speciation-dependent kinetics of bulk metal depletion. Overall, the work paves the way for the  
37 elaboration of new strategies to exploit the bioluminescence response of metal *lux*-biosensors at a  
38 dynamic level and evaluate metal bioavailability properties in environmental or biological aqueous  
39 samples.

40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 **1. Introduction.**

52 Persistence, bioaccumulation potential and toxicity are key factors currently used to classify metals  
53 (**M**) that pose a risk to living organisms in aqueous environmental media. Due to their interactions with  
54 organic and inorganic metal-binding ligands (**L**), metals exist in various physicochemical forms or species  
55 (**ML**) that differ in terms of chemical reactivity, which in turn impacts on their fate, transport,  
56 bioavailability and toxicity.<sup>1</sup> Accordingly, metal risk assessment generally requires the evaluation of metal  
57 speciation in solution.<sup>2</sup> This explains why much effort has been spent on developing equilibrium models  
58 that predict the solubility and stability of complexed metal forms, e.g. NICA-Donnan, WHAM and  
59 extensions thereof, and freeware chemical models like Visual MINTEQ.<sup>3-6</sup> The relationship between metal  
60 speciation and bioavailability to metal-accumulating microorganisms (e.g. bacteria, microalgae) has  
61 further received a lot of attention in literature.<sup>1</sup> In particular, the Biotic Ligand Model (BLM) makes the  
62 distinction between total metal activity and activity of free (not complexed) metal M as the determinant  
63 bioavailability parameter.<sup>7</sup> In detail, BLM assumes a priori the existence of a full equilibrium between M  
64 activities in bulk solution and at the surface of the metal-consuming microorganism, so that the only  
65 parameter determining metal bioavailability of bioinactive (i.e. non-bioaccumulated) ML complex is the  
66 bulk activity of M.<sup>8,9</sup> Within such an equilibrium representation of metal species partitioning at  
67 microorganism/medium interfaces, metal complexation therefore leads only to a decrease in the bulk  
68 concentration of free metal ions M.

69 Whereas BLM constitutes an interface within regulatory arena, its failure to predict metal  
70 bioaccumulation has long been reported for a variety of organisms and metals under both complexing  
71 *and* non-complexing medium conditions.<sup>8-12</sup> One of the BLM limits at the origin of such a failure stems  
72 from its restrictive equilibrium-based assessment of the dynamic processes that control the intertwined  
73 reactive transport of metals (free and complexed) from the solution to the microorganism and the  
74 accumulation of the bioactive free metal forms (or any others if relevant).<sup>8-12</sup> In particular, BLM does not  
75 account for the lability of metal complexes, i.e. the extent to which ML dissociates and releases free M on  
76 the timescale of its diffusion towards the bioaccumulating surface.<sup>11-14</sup> Then, depending on the demands  
77 of the organism and on the lability of ML complex, the latter may dissociate in the vicinity of the organism  
78 and thereby *contributes* to the biouptake of free M (**Figure 1**).<sup>11,13,14</sup> Concepts have been developed for  
79 describing the dynamics of chemical speciation in aqueous media in the context of an ongoing interfacial  
80 process that consumes free metals at a given surface, may it be a metal-sensor or a microorganism.<sup>9</sup> Based  
81 on these concepts, it was shown that applicability of BLM is conditioned to a sufficiently fast transport of  
82 metal species in solution as compared to the actual metal uptake so that the latter is rate-determining.

83 An additional limitation in the application of BLM when combined to classical thermodynamic speciation  
84 computations is its incapacity to address whether or not metal depletion from bulk solution is operative  
85 during bioaccumulation.<sup>12,15-17</sup> This issue is however crucial as metal depletion - when significant - leads  
86 necessarily to a decrease in bioavailable M concentration over time. Theoretical studies confronted to  
87 experiments have solved this problem on the basis of a *non-equilibrium flux-based approach* with or  
88 without account of metal speciation in solution, intracellular M complexation and organism ability to  
89 excrete internalized M for detoxification purpose.<sup>12,15-19</sup> The common denominator of these studies is their  
90 modelling of M biointerfacial partitioning without invoking a priori the equilibrium hypothesis formulated  
91 in BLM.

92 Parallel to the above modelling developments on metal bioavailability, the advent of cutting-edge  
93 biotechnologies like luminescent whole-cell metal bacterial reporters (or biosensors) has provided  
94 environmental chemists with a tool to *measure* bioavailable metal concentration in aqueous solution  
95 (**Figure 1**).<sup>20</sup> Briefly, *lux*-reporter genes introduced in a given host bacterium are fused to a promoter  
96 whose expression is regulated by a regulatory (or repressor) protein,  $P_{reg}$ , that has a strong affinity for the  
97 metal to be detected. In the absence of the metal, the expression of the reporter gene is repressed by the  
98 repressor attached to the promoter and bacteria do not produce luminescence. Inactivation of the  
99 repressor occurs when the latter forms a  $MP_{reg}$  complex with internalized M, which initiates the  
100 expression of *lux* gene and the production of the reactants required for bioluminescence reaction,  
101 including the reporter protein (luciferase) that acts as a reaction catalyst.<sup>20</sup> Advantages of so-engineered  
102 metal biosensors include the possible exploration of a large spectrum of metal speciation scenarios *via*  
103 cost-effective *and* automated measurement of the bioluminescence response over several tens of hours  
104 with minute-timestep resolution.<sup>21</sup> However, despite the (apparent) simplicity of their functioning, one of  
105 the clear downsides to the use of metal *lux*-bioreporters is that interpretation of the bioluminescence  
106 signal is far from easy. Indeed, quantifying metal bioavailability from bioluminescence output requires not  
107 only the integration of the relevant physical and chemical processes that determine biointerfacial metal  
108 partitioning over time (**Figure 1**),<sup>22</sup> but also the way in which cell metabolism of nutrients from the  
109 medium can sustain light production after metal-triggered actuation of the promoter.<sup>21,23</sup> As an  
110 illustration, recent work demonstrated that cell stringent response and catabolite repressions may lead  
111 to bioluminescence signals over time that feature one, two or three peaks depending on the bioavailability  
112 of amino acids and sugars in solution, some of these peaks being doublets or even presenting marked  
113 truncations.<sup>21,23</sup> Due to this complexity, the exploitation of bioluminescence cell signals remains  
114 essentially limited so far to (i) mere consideration of the only maximal signal amplitude without

115 mechanistic analysis of the signal dependence on time, (ii) the recourse to calibration measurements for  
116 converting bioluminescence into bulk concentration of free metal estimated by thermodynamic  
117 speciation computations within restrictive equilibrium BLM framework, or (iii) empirical fitting of time-  
118 dependent bioluminescence data collected for different metal contents in solution.<sup>20,24-26</sup>

119 In view of the above elements, force is to recognize the lack of a comprehensive theory for a full  
120 exploitation of the time-response of luminescent metal biosensors and the evaluation of metal  
121 bioavailability properties beyond the limits of equilibrium BLM. Accordingly, we extend herein our recent  
122 model on bioluminescence emission by metal biosensors<sup>22</sup> to cases where media contain metal-binding  
123 ligands and metal may be depleted from bulk solution in the course of time. Following the idea in [22],  
124 the model integrates the contribution of cell metabolism to the produced signal via a differentiation  
125 between photoactive and photoinactive cells in solution. It further formulates explicitly the connection  
126 between bioluminescence signal and bioavailability of metal species, which includes not only bioactive M  
127 but also labile ML that can contribute to M biouptake. The analysis accounts for cell metal excretion,  
128 intracellular metal complexation, interconversion between M and ML forms during their (coupled)  
129 diffusions to the biosensor surface, and depletion of M from bulk solution as a result of M bioaccumulation  
130 by the metal-sensing cells. Among the important results reported here, we demonstrate how *the*  
131 *amplitude, shape and time of apparition* of the bioluminescence signal depend on the concentrations of  
132 biosensor and metal-binding ligand in solution, and how these signal properties reflect the  
133 thermodynamic *and* kinetic determinants of metal speciation and related metal bioavailability features.  
134 Accordingly, this work defines a solid theoretical basis for the development of new procedures to unravel  
135 the contributions of biology (cell metabolism) and interfacial physical-chemistry (metal  
136 bioavailability/speciation) to the bioluminescence response of metal *lux*-biosensors.

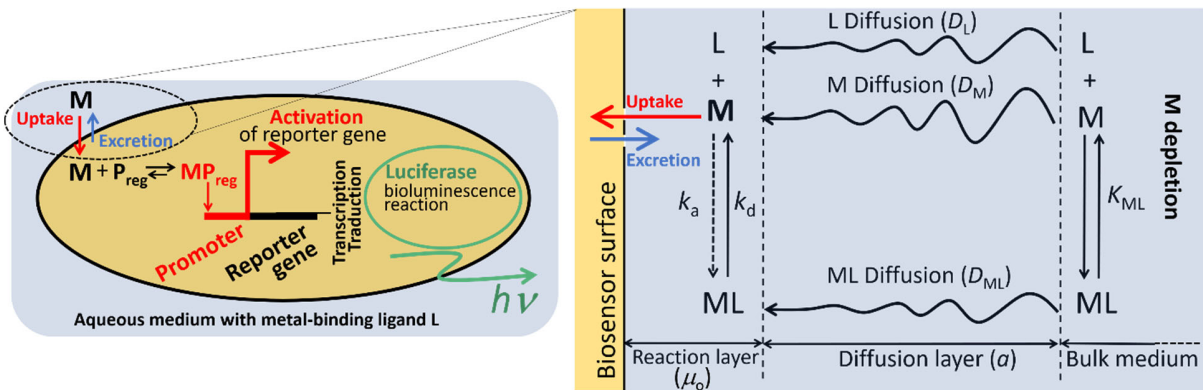
137

138

139

140





**Figure 1. (Left panel)** Simplified scheme for the functioning principle of a metal (M)-responsive luminescent bacterial sensor. **(Right panel)** Schematics of the transport and chemical kinetic contributions to the overall flux of (bioactive) metal ions at the interface between a metal biosensor and aqueous solution. The work aims at formulating quantitatively the connections between the time-dependent bioluminescence response of the biosensor, and the bioavailability of the metal species via account of the interplay between metal complex (ML) chemodynamics, diffusive transports of M, metal-binding ligand (L) and ML (with associated diffusion coefficients  $D_{i=M,L,ML}$ ), and kinetics of metal depletion from bulk solution. In the right panel, the reaction layer (thickness  $\mu_o$ ) and the diffusion layer (thickness  $a$ , the curvature radius of the metal sensing bioparticle) are indicated. See text for details.

141

## 142 2. Dynamics of biointerfacial metal partitioning: governing equations, results and discussion.

### 143 2.1. Setting the stage.

144 We consider an aqueous medium of volume  $V_T$  containing metal-accumulating bacteria (the  
 145 bioluminescent metal biosensors) assimilated to spheres of radius  $a$ , metal ions M and metal-binding  
 146 ligands L (**Figure 1**). The complexation reaction  $M+L \rightleftharpoons ML$  leads to the formation of ML complexes with  
 147 stability constant denoted as  $K_{ML}$  ( $m^3 mol^{-1}$ ) defined by  $K_{ML} = k_a / k_d$  where  $k_a$  ( $m^3 mol^{-1} s^{-1}$ ) and  $k_d$  ( $s^{-1}$ )  
 148 are the kinetic constants for ML formation and dissociation, respectively. Expressions of  $k_a$  and  $K_{ML}$  for  
 149 the here-considered molecular ligands L follows Eigen mechanism for ions pair association<sup>27</sup> and Eigen-  
 150 Fuoss theory,<sup>28,29</sup> respectively. The total concentration of bacteria is expressed by their number density  
 151  $c_B$  (in  $m^{-3}$ ) taken independent of time  $t$  for the sake of simplicity. The formalism is thus applicable to  
 152 situations where bacterial growth is insignificant, which is achieved in minimal nutritive media.<sup>21-23</sup>  $c_B$  is  
 153 related to the volume fraction of bacteria in solution  $\varphi$  via  $c_B = \varphi / V_B$  with  $V_B = 4\pi a^3 / 3$  the volume of  
 154 an individual bacterium. The developments below hold under conditions where the electrostatic charges  
 155 distributed at the surface of the metal-sensing cells are screened, i.e. in media whose ionic strength is  
 156 sufficiently high. At  $t = 0$ , metal ions are introduced in the medium with bulk concentration  $c_M^{*,0}$  ( $mol m^{-3}$ ).  
 157 For the sake of demonstration, free metal ions M are viewed as the only metal species that can be

158 accumulated by the bacteria (i.e. they are the only bioactive metal forms) and excreted to some extent  
 159 via dedicated metal efflux pumps. We denote as  $k_e$  ( $s^{-1}$ ) the kinetic constant for metal excretion, and the  
 160 corresponding metal excretion flux,  $J_e$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), is written  $J_e = k_e \phi_M$  where  $\phi_M$  ( $\text{mol m}^{-2}$ ) is the  
 161 concentration of intracellular free M expressed per microorganism surface area.<sup>12,30-32</sup> After their  
 162 internalisation, free metal ions are bound by the intracellular regulatory proteins  $P_{\text{reg}}$  to form metal-  
 163 repressor complexes,  $MP_{\text{reg}}$ . In the following, we denote as  $k_{\text{a,i}}^*$  and  $k_{\text{d,i}}^*$  the kinetic constants of association  
 164 between M and  $P_{\text{reg}}$ , and dissociation of intracellular  $MP_{\text{reg}}$ , respectively. Based on theory for  
 165 chemodynamics of complexes formed between metals and nanoparticulate ligands ( $P_{\text{reg}}$  being a  
 166 representative thereof),<sup>33,34</sup> the constants  $k_{\text{a,i}}^*$  and  $k_{\text{d,i}}^*$  integrate here the coupling between the  
 167 conductive-diffusion transport of intracellular free M to/from the metal binding sites carried by  $P_{\text{reg}}$  and  
 168 the kinetics of the chemical binding step. The  $MP_{\text{reg}}$  complexes interact with the promoter placed  
 169 upstream the *lux* reporter gene (**Figure 1**), which initiates the transcription of that gene and the  
 170 production of the reporter protein (luciferase) that plays a central role in bioluminescence reaction. The  
 171 modelling of the kinetics of the intracellular biochemical reactions leading to bioluminescence, from the  
 172 very activation of the promoter by  $MP_{\text{reg}}$  to the production of luciferase, follows the scheme we  
 173 formulated elsewhere<sup>22</sup> for metal biosensors in non-complexing metal media and absence of metal  
 174 depletion from bulk solution.

175 Following previous reports,<sup>12,17</sup> it is convenient to formulate the spatial distribution of biosensors in  
 176 solution according to a Kuwabara cell representation. Within the framework of the latter, each individual  
 177 metal-sensing bacterium is enveloped by a virtual cell of radius  $r_c$  such that the bacterium /solution  
 178 volumes ratio in that cell equates with the one prevailing in the entire medium, i.e.  $r_c = a\varphi^{-1/3}$ . Due to the  
 179 accumulation of M in the bacterial body (internalisation), the concentration of M in bulk solution at time  
 180  $t$ , denoted as  $c_M^*(t)$  ( $\text{mol m}^{-3}$ ), may differ from  $c_M^{*,0}$  as a result of M depletion from bulk solution. Steady-  
 181 state M diffusion is readily achieved at any  $t$  for organisms with micrometric dimension like bacteria,<sup>15</sup>  
 182 and the corresponding  $\sim$ ms timescale required for building up a metal diffusion layer at the  
 183 organism/solution interface (transitory diffusion regime) is much faster than the typical timescales  
 184 associated with M internalisation and depletion from bulk solution ( $\sim$ mins to hrs).<sup>15,16,18</sup> It was further  
 185 shown<sup>15</sup> that *steady-state* M transport from solution to the M-accumulating biosurface actually applies at  
 186 any  $t$  while M bulk concentration is being depleted provided that  $\varphi$  is much lower than unity (in line with  
 187 typical bioassays conditions). The radial coordinate  $r$  is adopted and the origin is taken at the  
 188 microorganism centre. The position  $r = a$  marks the location of the membrane where M internalisation

189 takes place via dedicated metal transporters. A glossary of all symbols adopted in this work is provided at  
 190 the end of the document to facilitate reading.

191 In the developments below, we determine the spatial distributions of M, L and ML over time in the  
 192 extracellular domain ( $a \leq r \leq r_c$ ) and the expression of the metal bioaccumulation flux as a function of the  
 193 relevant thermodynamic and kinetic descriptors of the problem (§2.2). We then formulate the connection  
 194 between metal bioavailability properties and bioluminescence response of the metal-sensing bacteria  
 195 (§3.1), and we discuss the outcome of theoretical predictions with few computational examples that  
 196 illustrate the dependence of signal amplitude, shape and apparition delay on the concentrations of  
 197 biosensor and metal-binding ligand in solution (§3.2-§3.3). The expressions reported hereafter for the  
 198 time-response of luminescent metal biosensors and for metal partitioning at the biosensor/medium  
 199 interface under bulk metal depletion condition were derived with the support of PTC Mathcad Prime 8  
 200 calculus environment. All demonstrations are available upon request, together with the numerical code  
 201 developed to simulate biosensor signals.

202

## 203 **2.2. Metal bioavailability at the biosensor/solution interface under bulk metal depletion condition.**

### 204 *2.2.1. Extracellular distribution of metal species, expression of metal supply flux at the biosensor surface.*

205 Under the conditions detailed in §2.1, the concentration profiles of M, L and ML in the diffusion layer  
 206 are at steady state while free metal M is being depleted in bulk solution on a time scale much longer than  
 207 the time needed for the re-adjustment of the M concentration profile.<sup>15</sup> In turn, the spatial distributions  
 208 of M, L and ML concentrations over time,  $c_{i=M,L,ML}(r,t)$ , are governed by the coupled steady-state Nernst-  
 209 Planck equations corrected for the kinetic terms pertaining to chemical ML formation and dissociation

$$\begin{cases}
 D_M \nabla_r^2 c_M(r,t) + k_d c_{ML}(r,t) - k_a c_{ML}(r,t) c_L(r,t) = 0 & \text{(a)} \\
 D_{ML} \nabla_r^2 c_{ML}(r,t) - k_d c_{ML}(r,t) + k_a c_{ML}(r,t) c_L(r,t) = 0 & \text{(b)} \\
 D_L \nabla_r^2 c_L(r,t) + k_d c_{ML}(r,t) - k_a c_M(r,t) c_L(r,t) = 0 & \text{(c)}
 \end{cases} \quad (1)$$

211 where  $\nabla_r^2$  is the Laplacian operator in spherical geometry. For cases of practical interest, L is in large  
 212 excess over M so that L concentration is essentially independent of  $r$  and  $t$ , and Eq. (1c) reduces to  
 213  $c_L(r,t) = c_L^*$  where  $c_L^*$  is the bulk concentration of L.<sup>35</sup> In bulk solution, far from the surface of the  
 214 microorganisms, equilibrated M and ML concentrations are then related linearly by  $\bar{K}_{ML} = c_{ML}^*(t) / c_M^*(t)$   
 215 where  $c_{i=M,ML}^*(t)$  are the bulk concentrations of M and ML at  $t$ , and  $\bar{K}_{ML}$  is the dimensionless ML stability

216 constant defined by  $\bar{K}_{ML} = K_{ML} c_L^*$ . The boundaries associated with the coupled differential Eqs. (1a)-(1b)  
 217 are provided by

$$218 \quad \begin{cases} c_{i=M,ML}(r=r_c, t) = c_{i=M,ML}^*(t) & \text{(a)} \\ c_M(r=a, t) = c_M^a(t) & \text{(b)} \\ D_{ML}(\partial c_{ML}(r, t) / \partial r|_{r=a}) = 0 & \text{(c)} \end{cases} \quad (2)$$

219 where Eq. (2a) reflects bulk condition, Eq. (2b) specifies that M concentration identifies with  $c_M^a(t)$  at the  
 220 surface of the bacteria ( $c_M^a(t)$  will be determined in §2.2.2), and Eq. (2c) states that ML complex is not  
 221 bioactive, i.e. not accumulated by the metal M-sensing bacteria. Following the procedure detailed  
 222 elsewhere,<sup>13,35</sup> the exact solution of Eqs. (1)-(2) can be written in the form

$$223 \quad \begin{cases} \bar{c}_M(r, t) = 1 - \frac{a}{r} [1 - \bar{c}_M^a(t)] \frac{\varepsilon \bar{K}_{ML} [e^{\bar{h}_a(1-r/a)} - (1-\alpha)e^{-\bar{h}_a(1-r/a)}] + [\alpha + \bar{h}_a(2-\alpha)](1-\varphi^{1/3} r/a)}{\alpha \varepsilon \bar{K}_{ML} + [\alpha + \bar{h}_a(2-\alpha)](1-\varphi^{1/3})} & \text{(a)} \\ \bar{c}_{ML}(r, t) = 1 - \frac{a}{r} [1 - \bar{c}_M^a(t)] \frac{[\alpha + \bar{h}_a(2-\alpha)](1-\varphi^{1/3} r/a) - [e^{\bar{h}_a(1-r/a)} - (1-\alpha)e^{-\bar{h}_a(1-r/a)}]}{\alpha \varepsilon \bar{K}_{ML} + [\alpha + \bar{h}_a(2-\alpha)](1-\varphi^{1/3})} & \text{(b)} \end{cases} \quad (3)$$

224 where we introduced the dimensionless M and ML concentrations  $\bar{c}_{i=M,ML}(r, t) = c_{i=M,ML}(r, t) / c_{i=M,ML}^*(t)$   
 225 and the scalar  $\alpha = 1 - e^{2\bar{h}_a(1-\varphi^{1/3})}$  with  $\bar{h}_a$  (dimensionless) defined by

$$226 \quad \bar{h}_a = \sqrt{\bar{k}_a} \sqrt{1 + 1 / (\varepsilon \bar{K}_{ML})} \quad (4)$$

227 The Damköhler number  $\bar{k}_a = k_a c_L^* a^2 / D_M$  in Eq. (4) can be seen as the dimensionless rate constant of ML  
 228 formation which compares the steady state M diffusional timescale,  $\tau_{SS} = a^2 / D_M$ , with the reaction  
 229 timescale  $1 / (k_a c_L^*)$ . Equivalently,  $\sqrt{\bar{k}_a}$  compares  $a$  with the thickness  $\mu_o$  of the so-called reaction layer  
 230 (**Figure 1**) defined by  $\mu_o = \sqrt{D_M / (k_a c_L^*)}$ , which represents the distance travelled by a free metal ion via  
 231 diffusion before it re-associates with L to form ML. The supply flux of M to the biosensor surface, denoted  
 232 as  $J_M$  (mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), is given at time  $t$  by  $J_M(t) = D_M (\partial c_M(r, t) / \partial r|_{r=a})$ . Using Eq. (3a), the result can be  
 233 recast in the concise form

$$234 \quad J_M(t) = p_{ML} D_M [c_M^*(t) - c_M^a(t)] / a \quad (5)$$

235 with  $p_{ML} = p_o / (1 - \varphi^{1/3})$ , and  $p_o$  is the (dimensionless) scalar defined by  $p_o = 1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi$  which quantifies  
 236 the contribution of ML to the M supply flux as a function of ML lability parameter  $\xi$  ( $0 \leq \xi \leq 1$ ) defined  
 237 by Duval et al.<sup>13</sup> for any  $\varphi$  (cf. Eq. (22) therein). In the limit  $\varphi \ll 1$ ,  $\xi$  reduces to<sup>13,35</sup>

238 
$$\xi \approx \sqrt{\bar{\kappa}_a} / \left( \sqrt{\bar{\kappa}_a} + \sqrt{\varepsilon \bar{K}_{ML}} \sqrt{1 + \varepsilon \bar{K}_{ML}} \right) \quad (6)$$

239 where  $\varepsilon = D_{ML} / D_M$  is the ratio between diffusion coefficients of ML and M. In line with earlier  
 240 conclusion,<sup>13,36</sup> the parameter  $\xi$  in the dilute limit is independent of the boundary condition adopted at  
 241 the surface of the M-consuming interfaces, i.e. on  $c_M^a(t)$ .

242 As detailed elsewhere,<sup>11,13,15</sup> criteria can be established to distinguish the nature of the contribution  
 243 (if any) of ML to the M supply flux,  $J_M$ , depending on ML lability parameter  $\xi$ . For the sake of  
 244 completeness and clarity, we recall briefly below the basic arguments. At the level of the (volume) reaction  
 245  $M+L \leftrightarrow ML$  in bulk solution, discrimination needs to be made first between *dynamic* and *inert* complexes  
 246 on the basis of the comparison between the characteristic lifetimes of M (given by  $1/k_a c_L^*$ ) and ML ( $1/k_d$   
 247 ) and timescale ( $\tau_{SS}$ ) for the steady state M diffusion from solution to the biosensor surface. In detail, ML  
 248 is *dynamic* in the time window  $\tau_{SS}$  with a resulting fast interconversion between M and ML if

249 
$$k_a c_L^* \tau_{SS} \gg 1 \text{ and } k_d \tau_{SS} \gg 1 \quad (7)$$

250 and ML is *inert* if

251 
$$k_a c_L^* \tau_{SS} \ll 1 \text{ and } k_d \tau_{SS} \ll 1 \quad (8)$$

252 In the latter case, ML does *not* contribute in any way to the M supply flux at the biosensor surface. For  
 253 *dynamic* complexes, different scenarios can be defined from the analysis of the  $J_M$ -flux property under  
 254 sink metal condition (i.e.  $c_M^a \equiv 0$ ), which comes to *qualify the maximal ML contribution to  $J_M$  within the*  
 255 *diffusion timescale  $\tau_{SS}$* . Namely, for  $\bar{\kappa}_a \rightarrow 0$  (i.e.  $\xi \rightarrow 0$  and  $p_o \rightarrow 1$ ), the flux  $J_M(t)$  reduces to  
 256  $J_M(t) = D_M c_M^*(t) / a$ : this is the situation where the only free metal M is relevant to the supply flux, and  
 257 ML behaves as if it is inert on the timescale of M diffusion. The other extreme  $\bar{\kappa}_a \gg 1$  (equivalent to the  
 258 condition  $k_a c_L^* \tau_{SS} \gg 1$ ) refers to dynamic ML complexes, and two limiting situations can be distinguished  
 259 depending on the nature of the ML contribution to the flux. In detail, for  $\bar{\kappa}_a \gg (\varepsilon \bar{K}_{ML})(1 + \varepsilon \bar{K}_{ML})$ , we have  
 260  $\xi \rightarrow 1$  (cf. Eq. (6)) and  $p_o \rightarrow 1 + \varepsilon \bar{K}_{ML}$ , and  $J_M$  then simplifies into  $J_M(t) = \bar{D}(t) c_{M,t}^* / a$ , where  
 261  $\bar{D}(t) = [D_M c_M^*(t) + D_{ML} c_{ML}^*(t)] / c_{M,t}^*$  ( $m^2 s^{-1}$ ) is the concentration-averaged diffusion coefficient of M and  
 262 ML at  $t$  with  $c_{M,t}^*(t)$  the total metal concentration ( $mol m^{-3}$ ) in bulk solution defined by  
 263  $c_{M,t}^*(t) = c_M^*(t)(1 + \bar{K}_{ML})$ : this is the *fully labile* ML case where ML contribution to the flux is of a purely  
 264 diffusive nature, with the equilibrium between M and ML being maintained at any position  $r$  in the

265 diffusion layer. For  $\bar{\kappa}_a \ll (\varepsilon \bar{K}_{ML})(1 + \varepsilon \bar{K}_{ML})$  - which implies the inequality  $\varepsilon \bar{K}_{ML} \gg 1$  so as to satisfy the  
 266 examined limit  $\bar{\kappa}_a \gg 1$  - the expressions of  $\xi$  and  $J_M(t)$  reduce to  $\xi \rightarrow \sqrt{\bar{\kappa}_a} / (\varepsilon \bar{K}_{ML})$  (i.e.  $p_o \rightarrow 1 + \sqrt{\bar{\kappa}_a}$   
 267 ) and  $J_M(t) = D_M c_M^*(t) / a + J_{kin}(t)$  with  $J_{kin}(t) = k_d c_{ML}^*(t) \mu_o$ : this is the *nonlabile* ML case where M  
 268 bioaccumulation is dictated by the diffusion of free M *and* the kinetics of ML dissociation at the surface  
 269 of the M-accumulating bacteria.

270

271 *2.2.2. Expressions for the metal biouptake flux, and the time-dependent concentrations of free metal*  
 272 *species in bulk solution, at the surface and in the intracellular body of the metal-accumulating bacteria.*

273 The uptake of free M by the bacteria is assumed to follow a Michaelis-Menten mechanism, which  
 274 corresponds to a fast langmuirian adsorption of M at the membrane transporter sites, followed by a rate-  
 275 limiting internalisation step with kinetic constant  $k_{int}$  (s<sup>-1</sup>).<sup>11,12,15,30,37</sup> In studies on metal monitoring by  
 276 bacterial reporters, the linear Henry regime for metal bioaccumulation is relevant as it corresponds to a  
 277 low coverage of the internalisation sites by M and to an ensuing linearity between bioluminescence at  $t$   
 278 and bioavailable metal concentration (cf. §3).<sup>23</sup> In this regime, the M biouptake flux  $J_u(t)$  reads as<sup>11,12,15,30</sup>

$$279 \quad J_u(t) = K_H k_{int} c_M^a(t) \quad (9)$$

280 with  $K_H$  (m) the Henry adsorption constant. Under steady state conditions, the metal supply flux  $J_M$   
 281 defined by Eq. (5) must equate at any  $t$  the difference between internalisation and excretion fluxes

$$282 \quad J_M(t) = J_u(t) - k_c \phi_M(t) \quad (10)$$

283 , where  $J_u(t)$  is given by Eq. (9), and  $\phi_M(t)$  (mol m<sup>-2</sup>) is the concentration of intracellular free M at time  
 284  $t$  per microorganism surface area (cf. §2.1). The derivative of  $\phi_M$  with respect to time corresponds to the  
 285 uptake flux  $J_u(t)$  corrected for M excretion and conversion of internalized M into MP<sub>reg</sub>, i.e.

$$286 \quad d\phi_M(t) / dt = J_u(t) - k_c \phi_M(t) - k_{a,i}^* \rho_s \phi_M(t) + k_{d,i}^* \phi_c(t) \quad (11)$$

287 where  $k_{a,i}^*$  and  $k_{d,i}^*$  were defined in §2.1,  $\phi_c(t)$  (mol m<sup>-2</sup>) is the concentration of intracellular MP<sub>reg</sub> complex  
 288 at  $t$  per unit cell surface area, and  $\rho_s$  is the molar concentration of metal binding sites carried by P<sub>reg</sub> and  
 289 smeared-out over the volume  $V_B$  of a bacterium. The counterpart of Eq. (11) for  $\phi_c(t)$  is written

$$290 \quad d\phi_c(t) / dt = k_{a,i}^* \rho_s \phi_M(t) - k_{d,i}^* \phi_c(t) \quad (12)$$

291 Finally, at any  $t$ , the level of metal depletion in bulk solution is determined by the amount of accumulated  
 292 and excreted free M according to the following metal mass balance condition

293 
$$\int_a^{r_c} r^2 \left\{ [c_M(r,t) + c_{ML}(r,t)] - [c_M(r,0) + c_{ML}(r,0)] \right\} dr = -a^2 \int_0^t [J_u(t) - k_c \phi_M(t)] dt \quad (13)$$

294 where the M and ML concentration profiles,  $c_{M,ML}(r,t)$ , are defined by Eq. (3).

295 The set of Eqs. (9)-(13) defines the time-dependent concentration of M in bulk solution and at the  
 296 biosensor/solution interface ( $c_M^*(t)$  and  $c_M^a(t)$ , respectively), and the concentrations of intracellular M  
 297 and MP<sub>reg</sub> ( $\phi_M(t)$  and  $\phi_c(t)$ , respectively) using the boundary conditions  $\phi_M(t=0) = \phi_c(t=0) = 0$ . After  
 298 some algebra and recourse to Laplace transform, it can be demonstrated that the bulk M concentration  
 299 at any time  $t$ ,  $c_M^*(t)$ , is determined by the following explicit expression

300 
$$c_M^*(t) / c_M^{*,0} = c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} - f_+ e^{-\bar{\omega}_+ \bar{t}} + f_- e^{-\bar{\omega}_- \bar{t}} \quad (14)$$

301 where  $c_M^{*,0} = c_M^*(t=0)$ ,  $c_M^*(t \rightarrow \infty) = c_M^{*,\infty}$ ,  $\bar{t} = t / \tau_{ai}$  is the dimensionless timescale with  $\tau_{ai} = 1 / (k_{ai}^* \rho_s)$

302 the lifetime of intracellular free metal M, and  $\bar{K}_i = \tau_{di} / \tau_{ai}$  is the stability constant of MP<sub>reg</sub> complex with  
 303  $\tau_{di} = 1 / k_{di}^*$  the lifetime of MP<sub>reg</sub>. The dimensionless factors  $f_{\pm}$  involved in Eq. (14) are further defined by

304 
$$f_{\pm} = \frac{[\lambda_o - (\bar{\omega}_{\pm} \bar{\tau}_o)^{-1}][1 + \bar{K}_i(1 - \bar{\omega}_{\pm})]}{(1 - \lambda_o) \bar{K}_i (\bar{\omega}_- - \bar{\omega}_+)} \quad (15)$$

305 where the (dimensionless) frequencies  $\bar{\omega}_{\pm}$  in Eq. (15) are given by

306 
$$\bar{\omega}_{\pm} = \frac{1}{2} \left( 1 + \frac{\zeta}{\bar{\tau}_o} + \frac{1}{\bar{K}_i} \right) \left( 1 \pm \sqrt{1 - 4 \frac{\bar{K}_i}{\bar{\tau}_o} (\zeta + \bar{K}_i) \left[ 1 + \bar{K}_i \left( 1 + \frac{\zeta}{\bar{\tau}_o} \right) \right]^2} \right) \quad (16)$$

307 The (dimensionless) timescale  $\bar{\tau}_o$  involved in Eqs. (15)-(16) is defined by  $\bar{\tau}_o = \tau_o / \tau_{ai}$  with the time  
 308 constant  $\tau_o$  (s) given by

309 
$$\tau_o = (1 + \bar{K}_{ML}) \left( \frac{a}{K_H k_{int}} \right) \left[ 1 + (p_{ML} Bn)^{-1} (1 - f_{a,M}) \right] \frac{1 - \varphi}{3\varphi} \quad (17)$$

310 while the dimensionless scalars  $\zeta$  and  $\lambda_o$  appearing in Eqs. (15)-(16) read as

311 
$$\zeta = 1 + (1 + \bar{K}_{ML}) \left( \frac{ak_e}{K_H k_{int}} \right) \frac{1 - \varphi}{3\varphi} \quad (18)$$

312 
$$\lambda_o = 1 / \left\{ 1 - \left[ 1 + (p_{ML} Bn)^{-1} \right] / \left[ (p_{ML} Bn)^{-1} f_{a,M} \right] \right\} \quad (19)$$

313 , respectively. The physical meanings of  $\tau_o$  and  $\zeta$  are thoroughly discussed in §2.2.3, together with the  
 314 implications of Eq. (14) in terms of dynamics of metal bioaccumulation. Eq. (16) is obviously meaningful  
 315 for values of  $\bar{K}_i$ ,  $\zeta$  and  $\bar{\tau}_o$  in line with a positive argument of the square root in Eq. (16) : a Taylor-series  
 316 expansion of that argument with respect to  $\varphi$  for the here-considered case of dilute cell suspension (

317  $\varphi \ll 1$ ) evidences that positivity of that argument is always verified. In Eqs. (17) and (19),  $Bn$  is the so-  
 318 called Bosma number<sup>38</sup> that compares the M diffusion conductance,  $a^{-1}D_M$  ( $m s^{-1}$ ), and the M  
 319 internalisation conductance  $K_H k_{int}$  ( $m s^{-1}$ )

$$320 \quad Bn = a^{-1}D_M / (K_H k_{int}) \quad (20)$$

321 The extremes  $Bn^{-1} \ll 1$  and  $Bn^{-1} \gg 1$  correspond to a metal bioaccumulation process that is rate-limited  
 322 by M internalisation kinetics and M diffusional transport, respectively. The (dimensionless) quantity  $f_{a,M}$   
 323 in Eqs. (17) and (19) depends on the cell volume fraction  $\varphi$  according to Eq. S1 given in **SI†**. For  $\varphi \ll 1$ , it  
 324 can be shown that  $f_{a,M}$  simplifies into the following expression that involves the ML lability parameter  $\xi$   
 325 defined by Eq. (6)

$$326 \quad f_{a,M} \approx 2^{-1} \varphi^{1/3} (1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi) / (1 + \varepsilon \bar{K}_{ML}) \quad (21)$$

327 At  $t \rightarrow \infty$ , the partitioning of free M between the solution and the intracellular volume of the bacteria  
 328 is fully equilibrated, and the resulting bulk metal concentration  $c_M^*(t \rightarrow \infty) = c_M^{*,\infty}$  involved in Eq. (14) can  
 329 be written in the concise dimensionless form

$$330 \quad c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} = \left[ 1 + \frac{1 + \bar{K}_i}{1 + \bar{K}_{ML}} \left( \frac{3\varphi}{1 - \varphi} \frac{K_H k_{int}}{ak_e} \right) \right]^{-1} \left( 1 - \frac{(p_{ML} Bn)^{-1}}{1 + (p_{ML} Bn)^{-1}} f_{a,M} \right) \quad (22)$$

331 Given the expression (14) that defines  $c_M^*(t)$ , using Eq. (10) we finally infer that the concentration of M  
 332 at the cell surface,  $c_M^a(t)$ , and the metal biouptake flux  $J_u(t)$  (Eq. (9)) are formulated according to

$$333 \quad c_M^a(t) = \frac{J_u(t)}{K_H k_{int}} = \frac{1}{1 + (p_{ML} Bn)^{-1}} \left[ c_M^*(t) + (p_{ML} Bn)^{-1} k_c \phi_M(t) / (k_{int} K_H) \right] \quad (23)$$

334 For the sake of completeness, we report in **SI†** the expressions obtained for the surface concentration of  
 335 M at equilibrium, denoted as  $c_M^a(t \rightarrow \infty) = c_M^{a,\infty}$ , and for the intracellular concentrations of free and  
 336 complexed metal, i.e.  $\phi_M(t)$  and  $\phi_c(t)$ , respectively (cf. Eqs. (S2)-(S5) in **SI†**).

337

### 338 2.2.3. Bulk metal depletion: timescales and equilibrium situation.

339 Equation (14) highlights that the bulk concentration  $c_M^*(t)$  of free metal M decreases over time  
 340 according to 2 exponential functions with associated timescales  $\tau_{\pm}$  defined by  $\tau_{\pm} = \tau_{a,i} \bar{\omega}_{\pm}^{-1}$  where  $\bar{\omega}_{\pm}$  are  
 341 given by Eq. (16) that involves the time constant  $\tau_o$  defined by Eq. (17). Interestingly, the decay of  $c_M^*(t)$   
 342 over time featured by Eq. (14) is similar to the double exponential form adopted in [39] to describe the  
 343 time-dependence of bulk protein concentration following protein adsorption and uptake by spherical



344 resin beads. Realizing that  $\tau_+ < \tau_-$ ,  $\tau_+$  and  $\tau_-$  feature the short- and long-term components of bulk M  
 345 depletion, respectively. We provide below a biophysical meaning of the processes having time constants  
 346  $\tau_{\pm}$ , and we identify the situations where bulk metal depletion kinetics is controlled by both  $\tau_+$  and  $\tau_-$ , or  
 347 by only one of these two timescales.

348  
 349 **Absence of M excretion.** For poorly-metal excreting bacteria, i.e. when M internalization is much faster  
 350 than excretion (i.e.  $k_e / k_{\text{int}} \rightarrow 0$ , or equivalently  $\zeta \approx 1$ , cf. Eq. (18)), it can be shown that the expressions  
 351 of  $\tau_{\pm}$  considered in the limits  $\tau_o / \tau_{\text{a.i}} \ll 1$ ,  $\tau_o / \tau_{\text{a.i}} \gg 1$ ,  $\bar{K}_i \ll 1$  (weak MP<sub>reg</sub> complex) or  $\bar{K}_i \gg 1$  (strong  
 352 MP<sub>reg</sub> complex) reduce to

$$353 \quad \begin{cases} \tau_+ \approx \min\left(\left(\tau_{\text{d.i}}^{-1} + \tau_{\text{a.i}}^{-1}\right)^{-1}, \tau_o\right) & \text{(a)} \\ \tau_- \approx \max\left(\left(\tau_{\text{d.i}}^{-1} + \tau_{\text{a.i}}^{-1}\right)^{-1}, \tau_o\right) & \text{(b)} \end{cases} \quad (24)$$

354 The term  $\left(\tau_{\text{d.i}}^{-1} + \tau_{\text{a.i}}^{-1}\right)^{-1}$  pertaining to one of the two kinetic components of bulk M depletion is determined  
 355 by the only time constants  $\tau_{\text{a.i}}$  and  $\tau_{\text{d.i}}$  for the formation and dissociation of intracellular MP<sub>reg</sub>,  
 356 respectively, with the kinetic limits  $\left(\tau_{\text{d.i}}^{-1} + \tau_{\text{a.i}}^{-1}\right)^{-1} \approx \tau_{\text{d.i}}$  and  $\left(\tau_{\text{d.i}}^{-1} + \tau_{\text{a.i}}^{-1}\right)^{-1} \approx \tau_{\text{a.i}}$  applicable to weak and strong  
 357 MP<sub>reg</sub> complexes, respectively. In contrast, the time constant  $\tau_o$  (Eq. (17)) relevant for the other  
 358 component of the depletion process (Eq. (24)) is *independent* of the chemodynamic properties of MP<sub>reg</sub>:  
 359 it simply corresponds to the timescale for transferring M from bulk solution to the intracellular cell volume  
 360 prior to its sequestration by P<sub>reg</sub>. The relative contributions of the short and long-term components to the  
 361 overall depletion process, as identified by Eq. (24) for  $k_e / k_{\text{int}} \rightarrow 0$ , depend on the respective magnitudes  
 362 of  $f_+$  and  $f_-$  (Eq. (15)) involved in the definition of  $c_M^*(t)$  (Eq. (14)). Combining Eqs. (24) and (15) with  
 363  $\tau_{\pm} = \tau_{\text{a.i}} \bar{\omega}_{\pm}^{-1}$ , we demonstrate that bulk M depletion for  $k_e / k_{\text{int}} \rightarrow 0$  in the limits  $\tau_o / \tau_{\text{a.i}} \ll 1$ ,  $\tau_o / \tau_{\text{a.i}} \gg 1$ ,  
 364  $\bar{K}_i \ll 1$  or  $\bar{K}_i \gg 1$  *systematically* proceeds according to a *single* exponential decaying function of time  
 365 with a single depletion time constant, denoted as  $\tau_{\text{depl}}$ , that identifies with  $\tau_o$ . The bulk M concentration  
 366 can then be approximated by

$$367 \quad c_M^*(t) / c_M^{*,0} \approx \left(1 - c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}\right) e^{-t/\tau_{\text{depl}}} + c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} \quad (25)$$

368 where  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  is defined by Eq. (22). Under the examined conditions, the presence of the intracellular  
 369 metal binding ligand P<sub>reg</sub> does not affect the kinetics of bulk M depletion nor the equilibrium bulk  
 370 concentration of M,  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$ . Indeed, regardless of the magnitude of  $\bar{K}_i$ ,  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  necessarily tends to 0

371 value for bacterial systems where M excretion is insignificant, which is inferred from Eq. (22) taken in the  
 372 limit  $k_e / k_{\text{int}} \rightarrow 0$ .

373 **Presence of M excretion.** When M efflux pumps are operational (i.e.  $k_e / k_{\text{int}} \neq 0$ ), the resulting M  
 374 excretion tends to *buffer* the concentration of M in solution so that the maximum level of depletion  
 375 reached at  $t \rightarrow \infty$  necessarily decreases as compared to the situation where excretion is not significant:  
 376 this is in line with the increase of  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  with increasing  $k_e / k_{\text{int}}$  at given  $\bar{K}_i$ , as formulated by Eq. (22).  
 377 In addition, at fixed value of  $k_e / k_{\text{int}}$ , Eq. (22) evidences that  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  now decreases with increasing  $\bar{K}_i$ :  
 378 M depletion at equilibrium is therefore enhanced by intracellular metal complexation process. The latter  
 379 counteracts indeed the excretion-mediated buffering of bulk M concentration to an extent that depends  
 380 on the ratio  $(1 + \bar{K}_i) / (k_e / k_{\text{int}})$  that is involved in Eq. (22).

381 For the case  $k_e / k_{\text{int}} \neq 0$  or, equivalently,  $\zeta > 1$  (cf. Eq. (18)), we report in **Table 1** the corresponding  
 382 expressions of  $\tau_{\pm}$  for the relevant limits  $\tau_o / \tau_{\text{ai}} \ll \zeta$ ,  $\tau_o / \tau_{\text{ai}} \gg \zeta$ ,  $\bar{K}_i \ll 1$  and  $\bar{K}_i \gg 1$  (Eqs. (26a,b),  
 383 (27a), (28a,b) and (29a) in **Table 1**, respectively). These expressions constitute the analogues of Eq. (24)  
 384 for cases where M excretion is significant. The obtained results are obviously more involved as the kinetics  
 385 of metal depletion is now determined by the complex interplay between M excretion and internalisation  
 386 (as subsumed in  $\zeta$ ), chemodynamics of  $\text{MP}_{\text{reg}}$  complex (via the time constants  $\tau_{\text{a,i}}$  and  $\tau_{\text{d,i}}$ ) and transfer  
 387 of M from solution to bacterial body (via the time constant  $\tau_o$ ). The conditions underlying the applicability  
 388 of a mono-exponential decrease of  $c_M^*(t)$  over time with associated depletion time constant  $\tau_{\text{depl}}$  (Eq.  
 389 (25)) are further identified in **Table 1** for each limit considered (Eqs. (26c,d), (27b,c), (28c) and (29b,c)) and  
 390 the corresponding expressions of  $\tau_{\text{depl}}$  are also specified. In particular, for  $\bar{K}_i \ll 1$ , bulk M depletion  
 391 kinetics is always captured by the single timescale  $\tau_{\text{depl}} \equiv \tau_o / \zeta$ , which is a factor  $1 / \zeta$  lower compared to  
 392 that discussed above for the situation where M excretion is insignificant: excretion thus decreases the  
 393 time required for M partitioning at the biointerface to reach equilibrium. In the extreme of infinitely fast  
 394 excretion ( $\zeta \rightarrow \infty$ ), bulk M concentration is buffered so efficiently that  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} \rightarrow 1$  (Eq. (22)), and M  
 395 depletion becomes then insignificant. For strong  $\text{P}_{\text{reg}}$  complexant ( $\bar{K}_i \gg 1$ ) under conditions where the  
 396 inequality  $\bar{\tau}_o / \zeta \gg 1$  is satisfied, e.g. for  $k_e \tau_{\text{a,i}} \ll 1$  (cf. Eqs. (17) and (18)),  $\tau_{\text{depl}}$  reduces to  
 397  $\tau_{\text{depl}} \approx 2\tau_{\text{a,i}} / (1 - \sqrt{1 - 4 / \bar{\tau}_o})$ , which is independent of the excretion kinetic constant  $k_e$ . This is the situation  
 398 where a sufficiently fast complexation of M by  $\text{P}_{\text{reg}}$  bypasses M excretion kinetics. The latter then becomes  
 399 immaterial in defining the partitioning of M over time at the biosensor/medium interface. The possible

400 existence of two timescales  $\tau_{\pm}$  for bulk M depletion kinetics and the aforementioned contributions of M  
 401 excretion and intracellular M complexation agree with conclusions by Duval et al.<sup>19</sup> and their numerical  
 402 analysis of M partitioning at a metal-accumulating interface in the scenario where metal complexation in  
 403 solution is not significant. In particular, we verified that Eq. (22) (or equivalently Eq. (30) reported below)  
 404 in the limit  $\bar{K}_{ML} = 0$  (absence of metal-complexing ligand in solution) correctly reproduces the ratio  
 405  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  evaluated in Ref. [19] under the conditions where cell electrostatics is screened and linear Henry  
 406 bioaccumulation regime applies, i.e.  $K_M / c_M^a(t) \gg 1$  where  $K_M$  relates to the M affinity for the metal  
 407 transporter sites at the bacterial membrane. Under such conditions, we further checked that the  
 408 characteristic depletion frequencies  $\bar{\omega}_{\pm}$  evaluated from Eq. (16) for strong  $P_{reg}$  complexants (i.e.  $\bar{K}_i \gg 1$ )  
 409 properly compare to values obtained from Eq. (36) in Ref. [19] valid for  $\bar{K}_i \gg 1$ .

410  
 411 **Effects of extracellular metal speciation and cell concentration on biointerfacial partitioning of metal**  
 412 **species.** The formulations obtained above for  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  (Eq. (22)) and for the time constant  $\tau_o$  (Eq. (17))  
 413 appearing in the defining expressions of both  $\tau_{\pm}$  and  $\tau_{depl}$  (cf. Eq. (24) and Eq. (26)-(29) in **Table 1**),  
 414 evidence that bulk M depletion kinetics is intrinsically controlled by: (i) the nature of the process that  
 415 limits the rate of metal bioaccumulation, as evidenced by the involvement of  $Bn^{-1}$  (Eq. (20)) in Eqs. (16)-  
 416 (22), (ii) the chemodynamics of intracellular  $MP_{reg}$  complex, via the involvement of  $\tau_{a,i}$  and  $\bar{K}_i$  in Eqs. (16)-  
 417 (22), (iii) the efficiency of M internalisation compared to excretion (via the ratio  $K_H k_{int} / k_e$ ), (iv) the  
 418 thermodynamics of extracellular metal speciation via the dependence of Eqs. (16)-(22) on ML stability  
 419 constant  $\bar{K}_{ML}$ , and finally (v) the bioavailability of ML complex, via the lability parameter  $\xi$  entering the  
 420 definition of  $p_{ML}$  and  $f_{a,M}$  (cf. §2.2.1 and §2.2.2). Substituting the defining expressions of  $p_{ML}$  (cf. below  
 421

<i>Considered limit</i>	<b>Corresponding expressions of <math>\tau_{\pm}</math> and <math>\tau_{depl}</math></b>
$\tau_o / \tau_{a,i} \ll \xi$	$\tau_+ \approx \tau_o / \xi \quad (a)$ $\tau_- \approx \tau_{d,i} / (1 + \bar{K}_i / \xi) \quad (b)$ $\tau_{depl} \equiv \begin{cases} \tau_+ & \text{for } \left  \frac{\bar{K}_i (\xi - 1)}{(\bar{K}_i + \xi)(\lambda_o \xi - 1)} \right  \ll 1 \quad (c) \\ \tau_- & \text{for } \left  \frac{\bar{K}_i (\xi - 1)}{(\bar{K}_i + \xi)(\lambda_o \xi - 1)} \right  \gg 1 \quad (d) \end{cases} \quad \text{Eq. (26a-d)}$
$\tau_o / \tau_{a,i} \gg \xi$	$\tau_{\pm} \approx 2\tau_{a,i} / \left\{ \frac{1 + \bar{K}_i}{\bar{K}_i} \left[ 1 \pm \sqrt{1 - \frac{4}{\bar{\tau}_o} \left( \frac{\bar{K}_i}{1 + \bar{K}_i} \right)^2} \right] \right\} + \left[ 1 \pm \left( \frac{\bar{K}_i - 1}{1 + \bar{K}_i} \right) / \sqrt{1 - \frac{4}{\bar{\tau}_o} \left( \frac{\bar{K}_i}{1 + \bar{K}_i} \right)^2} \right] \frac{\xi}{\bar{\tau}_o} \right\} \quad (a)$

	$\tau_{\text{depl}} \equiv \begin{cases} \tau_- \approx \tau_o / \zeta & \text{for } \bar{K}_i \ll 1 \text{ (b)} \\ \tau_- \approx 2\tau_{\text{a,i}} / \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\bar{\tau}_o}}\right) & \text{for } \bar{K}_i \gg 1 \text{ (c)} \end{cases}$	Eq. (27a-c)
$\bar{K}_i \ll 1$	$\begin{aligned} \tau_+ &= \tau_{\text{d,i}} \text{ (a)} \\ \tau_- &= \tau_o / \zeta \text{ (b)} \\ \tau_{\text{depl}} &\equiv \tau_- \text{ (c)} \end{aligned}$	Eq. (28a-c)
$\bar{K}_i \gg 1$	$\begin{aligned} \tau_{\pm} &\approx 2\tau_{\text{a,i}} / \left\{ \left(1 \pm \sqrt{1 - \frac{4\bar{\tau}_o}{(\bar{\tau}_o + \zeta)^2}}\right) \left(1 + \frac{\zeta}{\bar{\tau}_o}\right) + \frac{1}{\bar{K}_i} \left[1 \pm \left(\frac{\bar{\tau}_o - \zeta}{\bar{\tau}_o + \zeta}\right) / \sqrt{1 - \frac{4\bar{\tau}_o}{(\bar{\tau}_o + \zeta)^2}}\right] \right\} \text{ (a)} \\ \tau_{\text{depl}} &\equiv \begin{cases} \tau_- \approx 2\tau_{\text{a,i}} / \left(1 - \sqrt{1 - 4/\bar{\tau}_o}\right) & \text{for } \bar{\tau}_o \gg \zeta \text{ (b)} \\ \tau_- \approx \tau_{\text{a,i}} / \zeta & \text{for } \bar{\tau}_o \ll \zeta \text{ (c)} \end{cases} \end{aligned}$	Eq. (29a-c)

422

423 **Table 1.** Expressions of the time constants  $\tau_{\pm} = \tau_{\text{a,i}} \bar{\omega}_{\pm}^{-1}$  involved in the decay of bulk M concentration with time  
424 (Eq. (14)) within the limits specified in the left column where M excretion is accounted for (i.e.  $k_e / k_{\text{int}} \neq 0$  or  $\zeta > 1$   
425 (Eq. (18)). The (dimensionless) frequencies  $\bar{\omega}_{\pm}$  are defined by Eq. (16), and the timescale  $\tau_o = \bar{\tau}_o \tau_{\text{a,i}}$  (s) by Eq. (17).  
426  $\bar{K}_i = \tau_{\text{d,i}} / \tau_{\text{a,i}}$  is the stability constant of intracellular  $\text{MP}_{\text{reg}}$  complex, with  $\tau_{\text{d,i}}$  and  $\tau_{\text{a,i}}$  the lifetimes of  $\text{MP}_{\text{reg}}$  and  
427 intracellular M, respectively. The conditions (if any) required for the existence of a single bulk M depletion timescale,  
428  $\tau_{\text{depl}}$ , are further specified wherever necessary together with corresponding expressions of  $\tau_{\text{depl}}$ . See text for details.  
429

430 Eq. (5)) and  $f_{\text{a,M}}$  (Eq. (21)) into Eq. (22), we show that  $c_{\text{M}}^{*,\infty} / c_{\text{M}}^{*,0}$  depends on the descriptors of processes  
431 (i)-(v) listed above according to the explicit expression valid for  $\varphi \ll 1$

$$432 \quad c_{\text{M}}^{*,\infty} / c_{\text{M}}^{*,0} \approx \left(1 - \frac{Bn^{-1} \varphi^{1/3}}{1 + (1 + \varepsilon \bar{K}_{\text{ML}} \xi)^{-1} Bn^{-1} 2(1 + \varepsilon \bar{K}_{\text{ML}})}\right) / \left(1 + \frac{3K_{\text{H}} k_{\text{int}}}{ak_e} \frac{1 + \bar{K}_i}{1 + \bar{K}_{\text{ML}}} \varphi\right) \quad (30)$$

433 Similarly, substitution of  $p_{\text{ML}}$  and  $f_{\text{a,M}}$  into Eqs. (17)-(18) leads to the following expression of the  
434 timescale  $\tau_o / \zeta$  (which identifies to  $\tau_{\text{depl}}$  for e.g.  $\bar{K}_i \ll 1$ , cf. **Table 1**) in the dilute limit  $\varphi \ll 1$

$$435 \quad \tau_o / \zeta \approx \left\{1 + \frac{Bn^{-1}}{1 + \varepsilon \bar{K}_{\text{ML}} \xi} \left[1 - \left(\frac{3/2 + \varepsilon \bar{K}_{\text{ML}} (1 + \xi/2)}{1 + \varepsilon \bar{K}_{\text{ML}}}\right) \varphi^{1/3}\right]\right\} / \left(k_e + \frac{3K_{\text{H}} k_{\text{int}}}{a(1 + \bar{K}_{\text{ML}})} \varphi\right) \quad (31)$$

436 We discuss specifically in §2.2.4 how ML lability ( $\xi$ ) and bioaccumulation kinetics ( $Bn^{-1}$ ) impact M  
437 depletion thermodynamics and kinetics (Eqs. (30) and (31), respectively), and we analyse here the effects  
438 connected to M speciation is solution ( $\bar{K}_{\text{ML}}$ ) and to change in cell volume fraction  $\varphi$ . Briefly, Eqs. (30)-  
439 (31) evidence that both  $c_{\text{M}}^{*,\infty} / c_{\text{M}}^{*,0}$  and  $\tau_o / \zeta$  increase with increasing  $\bar{K}_{\text{ML}}$  ( $= K_{\text{ML}} c_{\text{L}}^*$ ) (up to leading-order  
440 terms in  $\bar{K}_{\text{ML}}$ ) at fixed  $\varphi$ , meaning that extracellular metal complexation acts as a buffer of bulk M  
441 concentration. In turn, increasing  $K_{\text{ML}}$  at fixed concentration  $c_{\text{L}}^*$  of L (which is realized in practice by

442 changing the nature of the ligand L) or increasing  $c_L^*$  at given  $K_{ML}$  leads to a reduction of M depletion at  
 443 equilibrium and to an increase in the delay needed to achieve this equilibrium. The effects caused by  
 444 extracellular M speciation on bulk M depletion are therefore opposite to those caused by intracellular M  
 445 sequestration by  $P_{reg}$ . The retardation of the equilibrium situation upon increasing ML stability agrees with  
 446 the conclusion by Pinheiro et al.<sup>15</sup> formulated for microorganisms devoid of intracellular M chelator (i.e.  
 447  $\bar{K}_i \rightarrow 0$ ) in the absence of M excretion (i.e.  $k_e \rightarrow 0$ ), and Eqs. (30)-(31) taken in these limits correctly  
 448 reproduce Eqs. (13)-(14) given in Ref. [15] for media where L is absent (i.e.  $\bar{K}_{ML} \rightarrow 0$ ). In addition, Eqs.  
 449 (30)-(31) provide a rationale of the (intuitive) connections existing between the equilibrium level and  
 450 kinetics of M depletion, and the concentration  $\varphi$  of biosensors, that is :  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  decreases with  
 451 increasing the amount of M-accumulating bacteria (cf. the leading order  $\varphi$ -term in Eq. (30)), and  
 452 increasing  $\varphi$  fastens the depletion process (cf. Eq. (31)). Finally, we infer from Eq. (30) that the conditions  
 453 marking a significant depletion of M from bulk solution can be formulated by the inequality  $\varphi \geq \varphi^*$ , where  
 454  $\varphi^*$  is the critical cell concentration that depends on the relevant parameters of the problem according to

$$\varphi^* = \frac{ak_e}{3K_H k_{int}} \frac{1 + \bar{K}_{ML}}{1 + \bar{K}_i} = \frac{a^2 k_e}{3D_M Bn^{-1}} \frac{1 + \bar{K}_{ML}}{1 + \bar{K}_i} \quad (32)$$

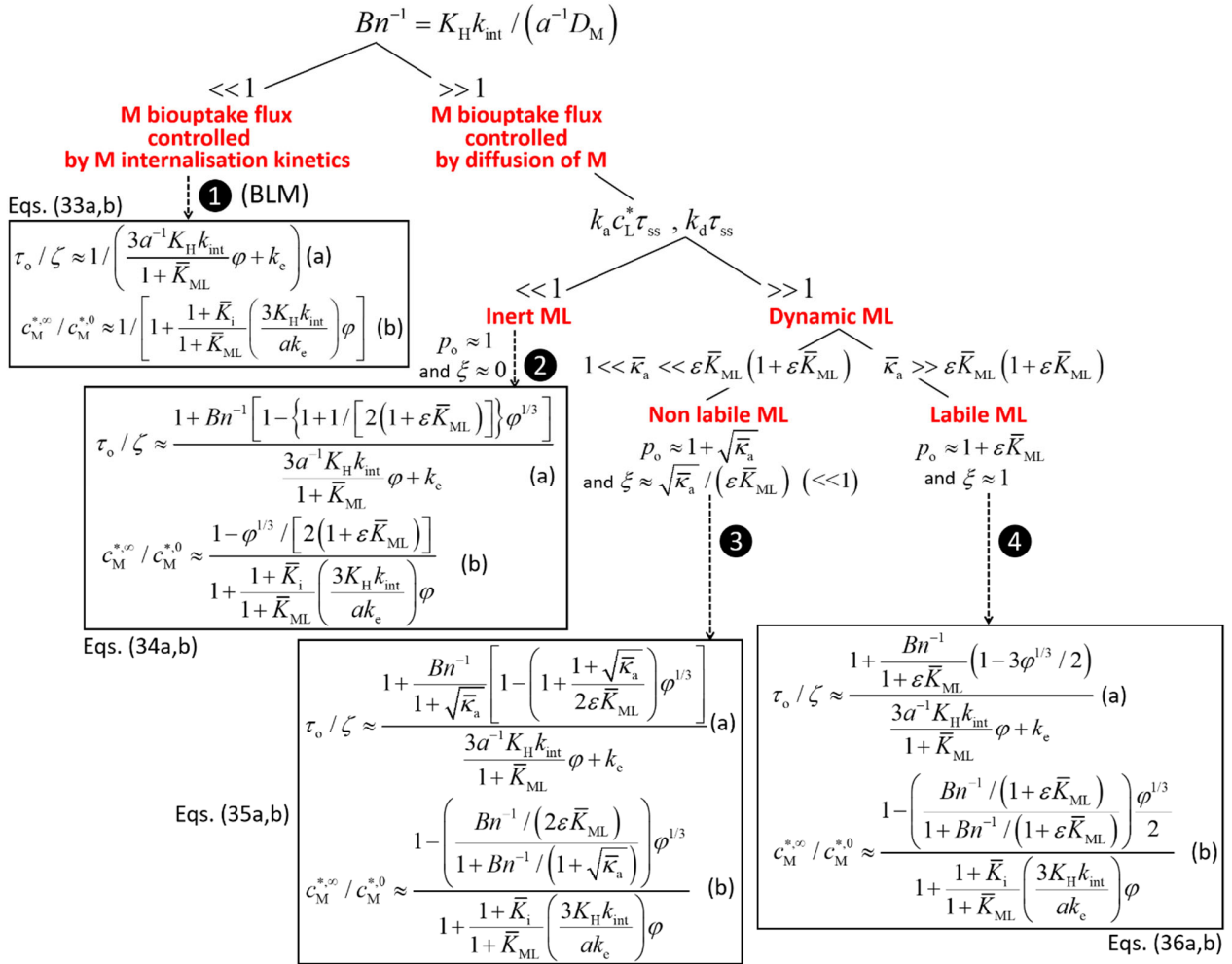
456 and the second equality in Eq. (32) follows directly from the definition of  $Bn^{-1}$  (Eq. (20)). The opposite  
 457 roles played by the intra- and extracellular ligands L and  $P_{reg}$  in terms of effects on depletion at equilibrium  
 458 are reflected by the ratio  $(1 + \bar{K}_{ML}) / (1 + \bar{K}_i)$ : the larger  $\bar{K}_{ML}$  is, the higher is the concentration of bacteria  
 459 required to deplete a given amount of M, and conversely for  $\bar{K}_i$ . The buffering of M concentration in  
 460 solution by excretion process is also correctly captured by Eq. (32): the more efficient is excretion (i.e.  $k_e$   
 461 is high), the larger becomes the concentration of bacteria needed to achieve a given M depletion level,  
 462 and conversely for high  $k_{int}$ .

#### 463 464 2.2.4. Metal bioavailability.

465 The expressions of  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  and  $\tau_o / \zeta$  given by Eqs. (30)-(31) depend on the ML lability parameter  
 466  $\xi$  which qualifies the nature and quantifies the magnitude of the contribution of ML complex to the M  
 467 bioaccumulation flux, with the differentiation between inert and dynamic ML ( $\xi \approx 0$  and  $\xi \neq 0$ ,  
 468 respectively) and, if dynamic, between non-labile and fully labile ML ( $\xi \approx \sqrt{\bar{K}_a} / \varepsilon \bar{K}_{ML}$  and  $\xi \approx 1$ ,  
 469 respectively), as explained in §2.2.1. The quantities  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  and  $\tau_o / \zeta$  further reflect the extent to which

470 M bioaccumulation is kinetically determined by M internalisation and/or M diffusion process, depending  
 471 on the magnitude of the reciprocal of the Bosma number,  $Bn^{-1}$  (Eq. (20)). We summarize in **Figure 2** all  
 472 conditions invoked in §2.2.1 that must be verified for ML complex to be inert, dynamic, and non-labile or  
 473 fully labile, while replacing them in the relevant limits  $Bn^{-1} \ll 1$  and  $Bn^{-1} \gg 1$  where biouptake is  
 474 controlled by M internalisation and M diffusion, respectively. For each case considered across the  
 475 spectrum of speciation and bioaccumulation dynamic scenarios, we report the corresponding limits of  
 476 Eqs. (30)-(31) pertaining to  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  and  $\tau_o / \zeta$  (Eqs. (33a,b)-(36a,b) in **Figure 2**). **Figure 2** thus extends  
 477 the results by Pinheiro et al.<sup>15</sup> valid under the strict conditions where metal excretion and intracellular  
 478 metal complexation were ignored, and they provide a so-far missing overview of the expressions that  
 479 govern metal depletion over time for all relevant limits of speciation and bioaccumulation dynamics.

480 For internalization-controlled bioaccumulation ( $Bn^{-1} \ll 1$ , case ❶ in **Figure 2**, Eqs. (33a,b)), there is  
 481 no limitation of the biouptake by M diffusion, the only free M concentration is relevant to the biouptake  
 482 and L simply acts as a buffer for the free M concentration in solution (§2.2.3). This is the conventional  
 483 situation treated by BLM where the surface concentration of M,  $c_M^a$ , is *a priori* assumed to equate with  
 484 the bulk M concentration,  $c_M^*$ , which actually corresponds to Eq. (23) taken in the limit  $Bn^{-1} \rightarrow 0$ . In  
 485 situations where bioaccumulation rate is limited by M diffusion ( $Bn^{-1} \gg 1$ ), the extent of ML dissociation  
 486 within the timescale  $\tau_{ss}$  for steady state diffusion of M to the biosensor surface becomes relevant to  
 487 discriminate inert from dynamic ML complexes. The conditions fulfilled by inert and dynamic ML are then  
 488 formulated by Eqs. (7) and (8). For inert ML (case ❷ in **Figure 2**, Eqs. (34a,b)), expressions of  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$   
 489 and  $\tau_o / \zeta$  basically merge (up to leading order terms in  $\varphi$ ) with those derived for case ❶ on the premise  
 490 that there is no concentration gradient at the biosurface, i.e.  $c_M^* = c_M^a$  or, equivalently,  $Bn^{-1} \rightarrow 0$ . For  
 491 dynamic ML (corresponding to  $\bar{\kappa}_a \gg 1$ ) the distinction between non-labile and fully labile ML complex  
 492 (cases ❸ and ❹, respectively) is tied to the applicability of the inequalities  $1 \ll \bar{\kappa}_a \ll (\varepsilon \bar{K}_{ML})(1 + \varepsilon \bar{K}_{ML})$   
 493 and  $\bar{\kappa}_a \gg (\varepsilon \bar{K}_{ML})(1 + \varepsilon \bar{K}_{ML})$ , respectively. The contribution of non-labile ML to bulk M depletion and M  
 494 transport is dominated by ML dissociation kinetics (case ❸, Eqs. (35a,b)). In the limit of fully labile ML,  
 495 ML dissociation kinetics is so fast that the contribution of ML to M bioaccumulation flux is entirely  
 496 governed by ML diffusion from bulk solution to the M-accumulating biointerface.



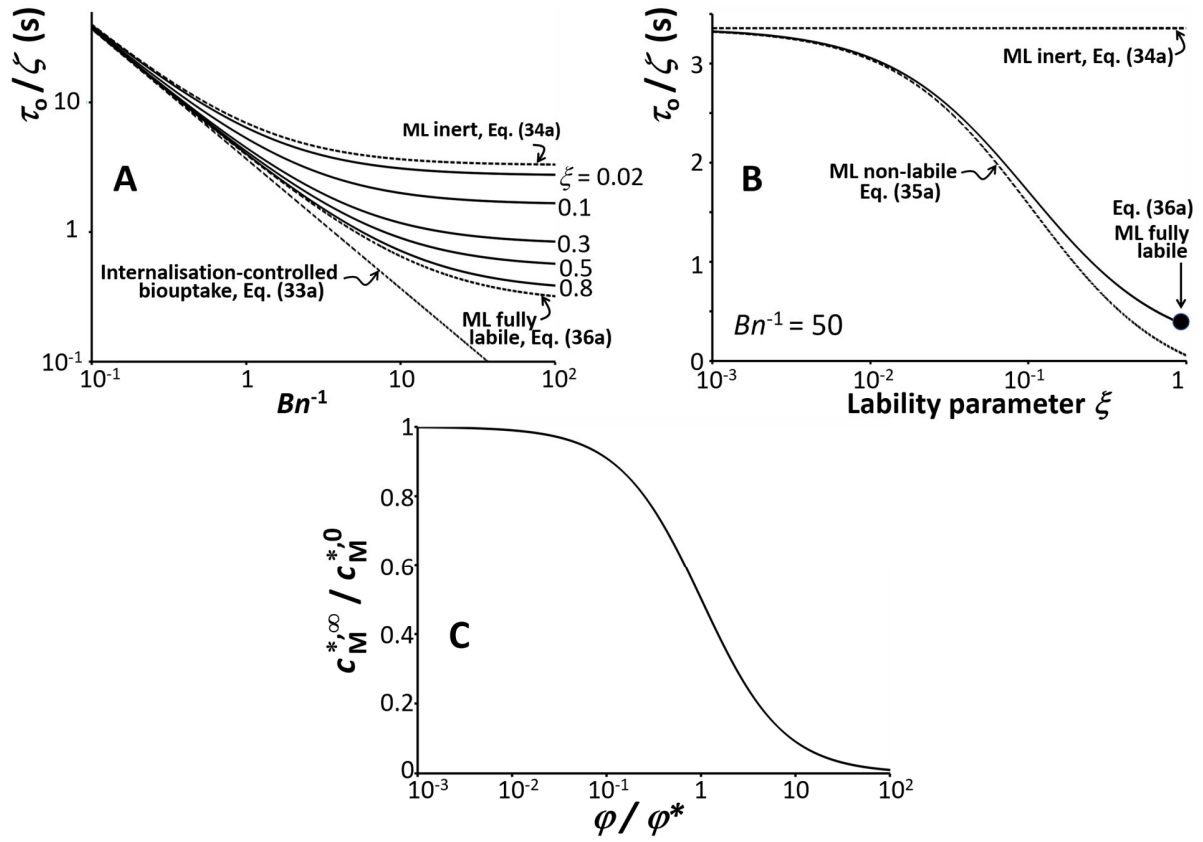
**Figure 2.** Conditional applications of the possible scenarios in terms of dynamics of metal bioaccumulation, and related contribution of ML complex to M biouptake flux ( $J_u$ ). Scenario **1** applies when bioaccumulation is limited by M internalisation kinetics without any resulting ML contribution to  $J_u$ . Scenario **2**, **3** and **4** refer to cases where M bioaccumulation is limited by M diffusion from bulk medium to the biosensor surface. More specifically, unlike cases **3** and **4**, case **2** is that where ML does not contribute to the M biouptake flux (inert ML). In cases **3** and **4**, the contribution of ML to  $J_u$  is determined by ML dissociation kinetics (non-labile ML) and ML diffusion (fully labile ML), respectively. For all cases, the expressions of  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  are provided together with those defining the time constant  $\tau_o / \zeta$  which corresponds to the M depletion timescale for weak intracellular MP<sub>reg</sub> (cf. **Table 2**). The timescale  $\tau_{\text{ss}} = a^2 / D_M$  in Figure 2 refers to steady state diffusion of M from solution to the accumulating biointerface. The Biotic Ligand Model (BLM) assumes equilibrium between metal affinity in bulk medium and at the biosensor surface (i.e.  $c_M^a(t) \equiv c_M^s(t)$ , cf. Eq. (23) for  $Bn^{-1} \rightarrow 0$ ), which corresponds to case **1**. All parameters are defined in the text and glossary of symbols. See text for details.

497 Using Eqs. (30)-(31), in **Figures 3A,B** we report computed variations of  $\tau_o / \zeta$  as a function of  $Bn^{-1}$   
 498 and ML lability  $\xi$ . For the sake of comparison, predictions from the relevant limiting expressions specified  
 499 in **Figure 2** are further reported. With increasing  $Bn^{-1}$ ,  $\tau_o / \zeta$  decreases at fixed  $\xi$ , meaning that it takes

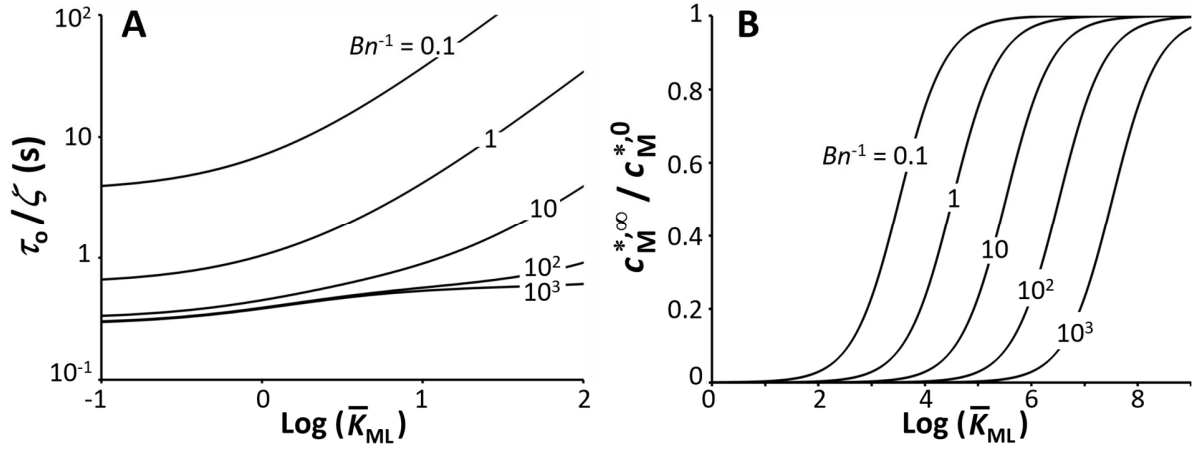
500 less time to deplete a larger amount of M when switching from internalised-controlled to diffusion-  
501 controlled M biouptake, which is line with a faster biouptake process achieved by increasing  $Bn^{-1}$ . For  
502 diffusion-controlled M biouptake (i.e.  $Bn^{-1} \gg 1$ ), increasing ML lability  $\xi$  leads to a decrease in  $\tau_o / \zeta$ : M  
503 depletion thus becomes faster when the contribution of ML to the uptake flux increases, i.e. from the  
504 non-labile to fully labile ML situations. **Figure 3C** further illustrates the expected decrease of  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  with  
505 increasing  $Bn^{-1}$  at fixed cell concentration or, equivalently, with increasing  $\varphi / \varphi^*$  (cf. Eq. (32)). The new  
506 feature is that the impact of ML lability  $\xi$  (which includes the variables  $\varepsilon \bar{K}_{ML}$  and  $\bar{\kappa}_a$ , cf. Eq. (6)) on  
507  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  is very moderate, as judged from the similarity of the curve computed for  $\xi = 0.5$  and those  
508 corresponding to the extremes of inert and fully labile ML complex (not shown). This result can be  
509 understood from inspection of Eqs. (30) and (34b)-(36b) where quantities  $\varepsilon \bar{K}_{ML}$  and  $\bar{\kappa}_a$  are systematically  
510 involved in  $\varphi$ -dependent terms that are much lower than unity. In turn,  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  (Eq. (30)) basically  
511 reduces to the simple expression  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} \approx (1 + \varphi / \varphi^*)^{-1}$  with  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} = 1/2$  for  $\varphi / \varphi^* = 1$ , in agreement  
512 with **Figure 3C**.

513 The buffering of bulk M concentration by ligand L in solution (as explained in §2.2.3) is illustrated in  
514 **Figure 4A** and **Figure 4B** by the increase of  $\tau_o / \zeta$  and  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  with increasing  $\bar{K}_{ML}$  at fixed values of  $\xi$   
515 and  $Bn^{-1}$ , respectively. **Figure 4** further reveals that the magnitude of this buffering effect is reduced as  
516 biouptake becomes increasingly controlled by M-transport (increasing values of  $Bn^{-1}$ ), in line with the  
517 decrease captured by **Figures 3A,B** for  $\tau_o / \zeta$  when lability of ML increases. Finally, **Figures 3-4** support  
518 the consistency between the results derived on the basis of Eqs. (30)-(31) and those obtained with the  
519 approximate Eqs. (33)-(36) within their applicable ranges of  $Bn^{-1}$  and  $\xi$  values (cf. **Figure 2**).





**Figure 3.** Variations of the time constant  $\tau_0 / \zeta$  (**A,B**) and (dimensionless) bulk M concentration at equilibrium,  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  (**C**) as a function of  $Bn^{-1}$  defined by Eq. (20) (**A**), ML lability parameter  $\xi$  (Eq. (6)) (**B**), and normalized cell volume fraction  $\phi / \phi^*$  where  $\phi^*$  is given by Eq. (32) (**C**). Model parameters if not specified in the figure:  $\bar{K}_{ML} = 10$ ,  $\phi = 10^{-3}$ ,  $\varepsilon = 1$ ,  $a = 1 \mu\text{m}$ ,  $D_M = 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_e = 0$  in (**A,B**),  $k_e = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and  $\bar{K}_i = 10$  in (**C**). The solid lines are predictions by Eq. (31) and Eq. (30) for  $\tau_0 / \zeta$  (**A,B**) and  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  (**C**), respectively. Dotted lines refer to results obtained with the expressions of  $\tau_0 / \zeta$  and  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  given in Figure 2 for internalisation-controlled M biouptake, inert ML, non-labile ML and/or fully labile ML (specified in Figure 3). Orders of magnitude for selected values of  $\phi$ ,  $k_e$  and  $\bar{K}_i$  conform to experimental data on Cd-excreting bacteria<sup>16</sup> and intracellular Cd complexation by metallothionein.<sup>18</sup>



**Figure 4.** Variations of the time constant  $\tau_0 / \zeta$  **(A)** and bulk M concentration at equilibrium  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  **(B)** as a function of dimensionless ML stability constant,  $\bar{K}_{ML} = K_{ML} c_L^*$ , for different values of  $Bn^{-1}$  (indicated). Model parameters if not specified in the figure:  $\varphi = 10^{-3}$ ,  $\varepsilon = 1$ ,  $a = 1 \mu\text{m}$ ,  $D_M = 10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $\xi = 0.5$ ,  $k_e = 0$  **(A)** and  $k_e = 10^{-3} \text{s}^{-1}$  **(B)**,  $\bar{K}_i = 10$  (only relevant in **(B)** because  $\tau_0 / \zeta$  is independent of  $\bar{K}_i$ , cf. Eq. (31)). The solid lines are predictions by Eqs. (31) and (30) for  $\tau_0 / \zeta$  and  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$ , respectively.

520

### 521 **3. Connections between metal partitioning dynamics at the biosensor/solution interface and** 522 **bioluminescence signal.**

#### 523 **3.1. Theoretical formulation.**

524 In the situations where M depletion from solution is insignificant (i.e. for  $\varphi \ll \varphi^*$ ), the  
525 bioluminescence  $Lum^{(0)}$  (in counts  $\text{s}^{-1}$ ) generated at time  $t$  by the bacterial metal sensors present at the  
526 (time-independent) concentration  $c_B = \varphi / V_B$  can be written in the form<sup>22</sup>

$$527 \quad Lum^{(0)}(t, c_M^{*,0}, \bar{c}_{B,p}(t)) = \psi \theta c_B \frac{K_H k_{int} c_M^{*,0} (1 - \tilde{K}_H S_a c_B)}{1 + (1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi)^{-1} Bn^{-1}} [F(t) \otimes \bar{c}_{B,p}(t)] \quad (37)$$

528 where the symbol  $\otimes$  is the convolution product, and we recall that the initial bulk concentration of free  
529 M,  $c_M^{*,0}$ , obeys the relationship  $c_M^{*,0} = c_{M,t}^{*,0} / (1 + \bar{K}_{ML})$  where  $c_{M,t}^{*,0}$  is the total bulk metal concentration  
530 (including M and ML species). We have specified in Eq. (37) that  $Lum^{(0)}$  depends on time  $t$ , on the relevant  
531 bulk concentration of free metal,  $c_M^{*,0}$ , and on the dimensionless time-dependent concentration  $\bar{c}_{B,p}(t)$  of  
532 *photoactive cells*, also termed *cell photoactivity*.<sup>22</sup> This concentration is defined by  $\bar{c}_{B,p}(t) = c_{B,p}(t) / c_{B,p}^{\max}$ ,  
533 where  $c_{B,p}^{\max}$  ( $\leq c_B$ ) is the maximum number density (in  $\text{m}^{-3}$ ) of photoactive bacteria the medium can  
534 sustain depending on the available resources required to convert internalized metal ions into light. For

535 medium compositions that exclude toxicity towards bacteria,  $\bar{c}_{B,p}(t)$  is an increasing sigmoid-like function  
536 of time,<sup>21-23</sup> independent of M concentration, with initial and end values  $\bar{c}_{B,p}(t=0)=0$  and  $\bar{c}_{B,p}(t \rightarrow \infty)=1$   
537 , respectively. Under such conditions, an increase in the total cell concentration  $c_B$  leads to an increase in  
538 the concentration of photoactive cells. As a first-order approximation, this connection is written in Eq.  
539 (37) according to the linear relationship  $c_{B,p}^{\max} = \theta c_B$  with  $0 < \theta \leq 1$ . The term  $(1 - \tilde{K}_H S_a c_B)$  in Eq. (37)  
540 corrects the free metal concentration  $c_M^{*,0}$  for the amount of M that is passively adsorbed at the biosensor  
541 surface (this metal fraction does not contribute to the bioluminescence signal), with  $\tilde{K}_H$  (in m) the  
542 adsorption constant in the here-considered linear Henry adsorption regime. Passive metal adsorption at  
543 bacterial surfaces is usually fast compared to internalisation and M depletion,<sup>15,16,30</sup> which leads to a fast-  
544 initial decrease of bulk M concentration, in agreement with electroanalytical measurements<sup>16</sup> and  
545 formulation in Eq. (37). The resulting quadratic dependence of  $Lum^{(0)}$  versus  $c_B$ , i.e.  
546  $Lum^{(0)} \sim c_B (1 - \tilde{K}_H S_a c_B)$ , has been validated by experimental data.<sup>40</sup> Eq. (37) holds for the practical case  
547  $t \gg \tau_q$ , where  $t$  typically exceeds hours and  $\tau_q$  (~min) is the characteristic duration of photon emission  
548 by luciferase-luciferin complexes.<sup>22</sup> In Eq. (37),  $\psi$  is defined by  $\psi = S_a V_T k_v k_f \tau_q K_{Hi}^{-1}$  (in counts  $s^{-1} mol^{-1} m^5$ )  
549 , with  $S_a$  the surface area of an individual biosensor,  $k_v$  (counts  $s^{-1} mol^{-1}$ ) is the kinetic constant for photon  
550 emission per mole of luciferase,  $k_f$  ( $mol m^{-3} s^{-1}$ ) is the kinetic constant for luciferase production, and  $K_{Hi}$   
551 ( $mol m^{-3}$ ) is the Hill constant that relates to the affinity of the promoter for the  $MP_{reg}$  complex (**Figure 1**).  
552 The term  $\frac{K_H k_{int} c_M^{*,0}}{1 + (1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi)^{-1} B n^{-1}}$  in Eq. (37) simply corresponds to the steady-state M biouptake flux in the  
553 absence of metal excretion (cf. Eq. (23) taken at  $t=0$ ). The dimensionless function  $F(t)$  in Eq. (37) is  
554 defined by Eq. (16) in our previous report<sup>22</sup> and it reflects the rate of variation of luciferase concentration  
555 with time, which is mediated by the dynamics of M partitioning at the biosensor/solution interface and  
556 by the kinetics of the intracellular processes leading to the expression of the reporter gene (*lux*). For  
557 practical situations of strong intracellular metal-chelators  $P_{reg}$  ( $\bar{K}_i \gg 1$ ) that significantly bypass M  
558 excretion (i.e.  $k_e \tau_{a,i} \ll 1$ ) and for  $k_r \tau_{a,i} \ll 1$  with  $k_r$  ( $s^{-1}$ ) the effective kinetic constant associated with the  
559 inhibition of luciferase production and/or activity, we have<sup>22</sup>

$$560 \quad F(t) \approx (1 - k_{eff} / k_r)^{-1} \left[ e^{-k_r t} - (k_{eff} / k_r) e^{-k_{eff} t} \right] \quad (38)$$

561 where  $k_{eff}$  ( $s^{-1}$ ) is defined by  $k_{eff} = k_e / \left\{ \bar{K}_i \left[ 1 + (1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi)^{-1} B n^{-1} \right] \right\}$ .<sup>21</sup>

562 Under conditions where bulk metal depletion is significant, i.e. for  $\varphi > \varphi^*$  (cf. §2.2.3), following the  
 563 bioluminescence modeling scheme detailed elsewhere<sup>22</sup> and correcting it for the dependence of bulk M  
 564 concentration on time, we straightforwardly obtain for the bioluminescence signal denoted as  $Lum(t)$

$$565 \quad Lum(t) = \psi \theta c_B \frac{K_H k_{int} c_M^{*,0} (1 - \tilde{K}_H S_a c_B)}{1 + (1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi)^{-1} B n^{-1}} \left\{ F(t) \otimes \left[ \left( \frac{c_M^*(t)}{c_M^{*,0}} \bar{c}_{B,p}(t) \right) \right] \right\} \quad (39)$$

566 where the ratio  $c_M^*(t) / c_M^{*,0}$  is defined by Eq. (14) whose limits are specified in **Figure 2** for the relevant  
 567 scenarios differing in terms of M bioaccumulation and speciation dynamics. For  $c_M^*(t) / c_M^{*,0} = 1$ , Eq. (39)  
 568 correctly reproduces the non-depletive situation covered by Eq. (37). In cases where M depletion kinetics  
 569 is determined by a single time constant  $\tau_{depl}$  (cf. Eq. (24) and **Table 1**), we argued that Eq. (25) reproduces  
 570 correctly the time-variation of  $c_M^* / c_M^{*,0}$ . Then, substituting Eq. (25) into Eq. (39) we show that the  
 571 expression of the bioluminescence signal  $Lum(t)$  with account of bulk M depletion can be written

$$572 \quad Lum(t) = Lum^{(0)}(t, c_M^{*,\infty}, \bar{c}_{B,p}(t)) + Lum^{(0)}(t, c_M^{*,0} - c_M^{*,\infty}, e^{-t/\tau_{depl}} \bar{c}_{B,p}(t)) \quad (40)$$

573 where  $Lum^{(0)}(t, x, y)$  is given by Eq. (37), and  $x$  and  $y$  are dummy arguments referring to bulk M  
 574 concentration and cell photoactivity, respectively. Eq. (40) explains how the bioluminescence signal  
 575  $Lum(t)$  is impacted by the kinetic and thermodynamic determinants of bulk metal depletion. Namely,  
 576  $Lum(t)$  can be viewed as the sum of two terms: the first term,  $Lum^{(0)}(t, c_M^{*,\infty}, \bar{c}_{B,p}(t))$ , corresponds to the  
 577 bioluminescence signal that would be obtained in the absence of M depletion but with setting the bulk M  
 578 concentration to  $x = c_M^{*,\infty}$  and the (time-dependent) cell photoactivity to  $y = \bar{c}_{B,p}(t)$ , while the second  
 579 term  $Lum^{(0)}(t, c_M^{*,0} - c_M^{*,\infty}, e^{-t/\tau_{depl}} \bar{c}_{B,p}(t))$  pertains to the signal in the absence of M depletion with  
 580  $x = c_M^{*,0} - c_M^{*,\infty}$  and  $y = e^{-t/\tau_{depl}} \bar{c}_{B,p}(t)$ . The underlying modifications of the bioluminescence signal due to  
 581 metal depletion are detailed in the next sections by analysing the dependence of  $Lum(t)$  on cell volume  
 582 fraction and concentration of metal-binding ligand in solution.

583

### 584 **3.2. Effects of cell volume fraction on the bioluminescence signal $Lum(t)$ .**

585 **Figures 5A,B** illustrate the changes of the bioluminescence signal caused by bulk M depletion upon  
 586 increasing cell volume fraction  $\varphi$ . The focus is given here on the analysis of the contribution of the **only**  
 587 convolution product in Eq. (39). For that purpose, results in **Figures 5A,B** are reported in the dimensionless  
 588 form  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  with  $\overline{Lum}(t) = Lum(t) / \left[ c_B (1 - \tilde{K}_H S_a c_B) \right]$  and  $\overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  is the maximum of

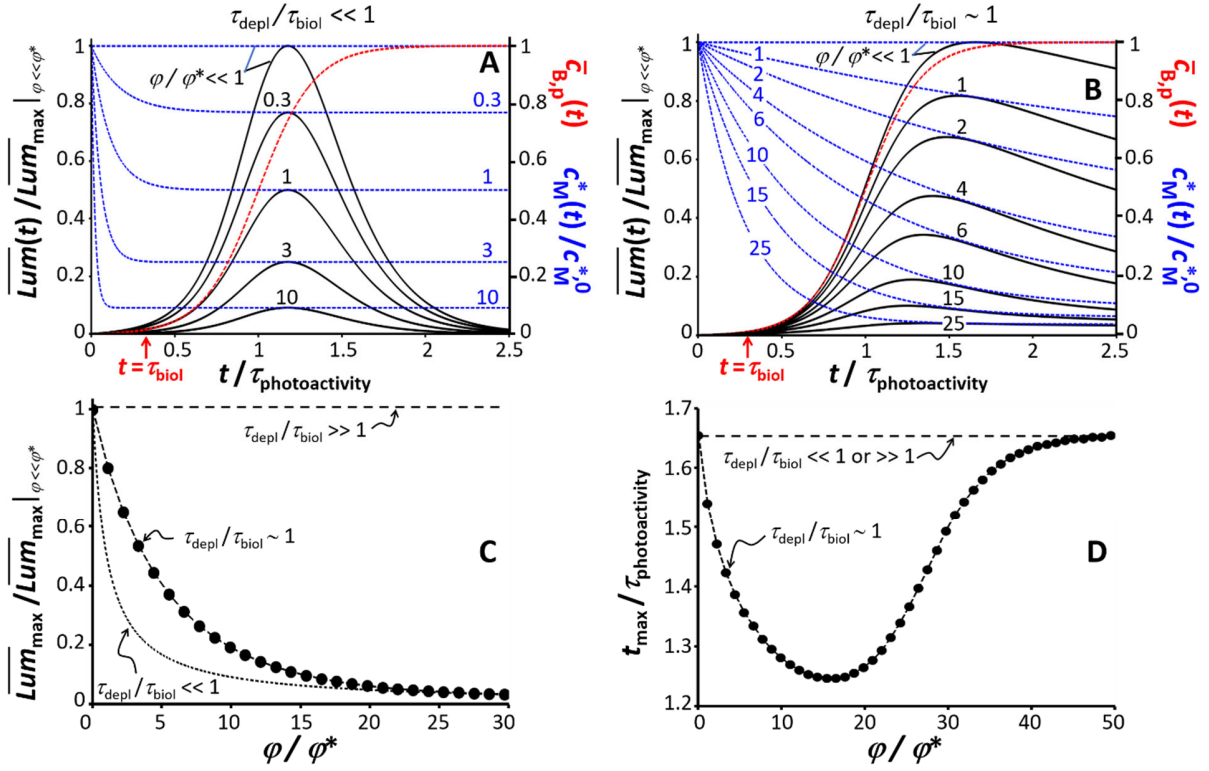
589 the bioluminescence signal  $\overline{Lum}(t)$  reached in the absence of M depletion, i.e. at  $\varphi \ll \varphi^*$ . Accordingly,  
 590 the ratio  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  basically reflects the (normalized) bioluminescence produced by a single  
 591 biosensor. For the sake of demonstration, we adopt a S-shaped increase of the cell photoactivity  $\bar{c}_{B,p}(t)$   
 592 with time (red dotted curve in **Figures 5A,B**), and we introduce the characteristic timescales  $\tau_{\text{photoactivity}}$  and  
 593  $\tau_{\text{biol}}$  at which  $\bar{c}_{B,p}(t)$  features an inflexion point and deviates significantly from 0, respectively. As detailed  
 594 elsewhere,  $\tau_{\text{biol}}$  marks the onset of bioluminescence increase with time and it is essentially controlled by  
 595 cell metabolism and nutritional quality of the medium.<sup>21,23</sup>

596 Starting from the situation  $\varphi \ll \varphi^*$ , increasing  $\varphi / \varphi^*$  leads to a decrease in bulk M concentration  
 597 from  $c_M^{*,0}$  to  $c_M^{*,\infty}$  within the period  $\sim \tau_{\text{depl}}$  (**Figure 5A**). If this depletion is completed before cells become  
 598 photoactive, i.e. for  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$ , the second term in Eq. (40) is 0, and the bioluminescence signal at any  
 599  $t$  will simply decrease by a factor  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} \sim 1 / (1 + \varphi / \varphi^*)$  (**Figure 3C**) as compared to the signal obtained  
 600 under non-depletive condition (**Figure 5A**). The bioavailable metal concentration perceived by the  
 601 biosensor (i.e.  $c_M^{*,\infty}$ ) can then significantly differ from the one prevailing at  $t = 0$  (i.e.  $c_M^{*,0}$ ) depending on  
 602 the magnitude of the ratio  $\varphi / \varphi^*$ .

603 In cases where  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**Figure 5B**), the second term in Eq. (40) contributes significantly to  
 604  $Lum(t)$ . In turn, for values of  $\varphi / \varphi^*$  underlying a significant bulk M depletion, the overall dependence of  
 605 the signal on time differs from the one that holds under non-depletive condition (**Figure 5B**). In detail,  
 606 while the maximum of the signal decreases with  $\varphi / \varphi^*$  as a result of decreasing  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$ , the position  
 607  $t_{\text{max}}$  marking that maximum is now shifted to lower values with increasing  $\varphi / \varphi^*$ . This shift is due to the  
 608 cross-talk between activation kinetics of cell photoactivity ( $\sim 1 / \tau_{\text{biol}}$ ) and M depletion kinetics ( $\sim 1 / \tau_{\text{depl}}$ ),  
 609 as subsumed in the second term of Eq. (40) (cf. the respective positioning of the blue and red dotted  
 610 curves in **Figure 5B**, and cf. **Figure S1** in SI† for further details). This cross-talk implies that a biosensor will  
 611 probe at time  $t$  a larger metal fraction as compared to the situation where  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$ . As a result, the  
 612 extent of decrease in  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  with  $\varphi / \varphi^*$  will be lower than that pertaining to the situation  
 613  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$ : this finding is illustrated in **Figure 5C** where  $\overline{Lum}_{\max} / \overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  is plotted versus  $\varphi / \varphi^*$   
 614 in the situations  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$ . Refined analysis of the dependence of  $t_{\text{max}}$  on  $\varphi / \varphi^*$

615 **(Figure 5D)** indicates that:  $t_{\max}$  first decreases with increasing  $\varphi / \varphi^*$  due to the aforementioned cross-talk  
616 between decay of bulk M concentration and increase in cell photoactivity over time, then  $t_{\max}$  reaches a  
617 minimum and finally increases at sufficiently large  $\varphi / \varphi^*$  towards the value achieved in the absence of M  
618 depletion. The latter increase of  $t_{\max}$  with  $\varphi / \varphi^*$  is explained by the corresponding change in  $\tau_{\text{depl}}$ : the  
619 larger is  $\varphi / \varphi^*$ , the faster the depletion process becomes (cf. Eq. (31) and **Figure 3A**), and for  $\varphi / \varphi^* \gg 1$   
620 bulk M depletion can therefore reach equilibrium before cell photoactivity has significantly increased.  
621 Accordingly, at sufficiently high  $\varphi / \varphi^*$  the overlap between the time-windows over which  $c_M^*(t)$   
622 decreases and  $\bar{c}_{\text{B,p}}(t)$  increases becomes considerably reduced, and  $t_{\max}$  then necessarily returns to the  
623 values that hold in the absence of M depletion, i.e. for  $\varphi / \varphi^* \ll 1$  (**Figure 5A**). This also explains why the  
624 ratios  $\overline{Lum}_{\max} / \overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  evaluated at sufficiently high  $\varphi / \varphi^*$  under the conditions of **Figures 5A** and **5B**  
625 are similar (**Figure 5C**).

626 Finally, in the trivial situation  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \gg 1$ , bulk M depletion is so sluggish that cell photoactivity has  
627 increased from 0 to 1 well before bulk M depletion started. A biosensor then essentially ‘feels’ the initial  
628 M concentration  $c_M^{*,0}$ , and the corresponding signal  $Lum(t)$  will remain independent of bulk M depletion  
629 (i.e.  $\varphi / \varphi^*$ , **Figures 5C,D**). Last, we mention that the shapes of the signals given for  $\varphi / \varphi^* \ll 1$  in **Figures**  
630 **5A** and **5B** are different because the transition between  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  (**Figure 5A**) to  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**Figure**  
631 **5B**) is realized here by decreasing the excretion kinetic constant  $k_e$  (which slows bulk M depletion down,  
632 cf. §2.2.3) while maintaining the value of  $\tau_{\text{biol}}$  identical in **Figures 5A** and **5B**. In turn, the time-dependence  
633 of  $F(t)$  in Eq. (39) is modified and, therewith, the shape of the signal  $Lum(t)$ , as detailed elsewhere.<sup>22</sup>



**Figure 5.** Illustrations of the dependence of the dimensionless bioluminescence signal  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{\max} \Big|_{\varphi < \varphi^*}$  on time (evaluated from Eq. (39)) for different normalized biosensor concentrations  $\varphi / \varphi^*$  (indicated) in the situations  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  (**A**) and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**B**).  $\tau_{\text{depl}}$  is the timescale for depletion of bulk M concentration (it depends on  $\varphi / \varphi^*$ ) and  $\tau_{\text{biol}}$  marks the onset of the increase in the concentration  $\overline{c}_{\text{B,p}}(t)$  of photoactive cells with time (red dotted curves). The time axis is scaled by  $\tau_{\text{photoactivity}}$  which is the time at which  $\overline{c}_{\text{B,p}}(t)$  features an inflexion point. Blue dotted curves represent the time-dependent (dimensionless) bulk M concentration,  $c_M^*(t) / c_M^{*,0}$ , evaluated for each selected  $\varphi / \varphi^*$  (Eqs. (14)-(22) or, equivalently, Eq. (25) under the conditions adopted in this figure). The (dimensionless) maxima of bioluminescence signals and their time-positions  $t_{\text{max}} / \tau_{\text{photoactivity}}$  under the conditions adopted in (**B**) (where  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$ ) are reported in (**C**) and (**D**), respectively. We further provide in (**C**) and (**D**) the (dimensionless) signal maxima and associated  $t_{\text{max}} / \tau_{\text{photoactivity}}$ , respectively, as a function of  $\varphi / \varphi^*$  in the extremes  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \gg 1$  (indicated). Unless otherwise specified in the figure, adopted model parameters are:  $\overline{K}_{\text{ML}} = 10$ ,  $\varepsilon = 1$ ,  $a = 1 \mu\text{m}$ ,  $D_{\text{M}} = 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $Bn^{-1} = 0.1$ ,  $\xi \rightarrow 0$ ,  $\overline{K}_i = 10$ ,  $\tau_{\text{a,i}} = 0.1 \text{ s}$ ,  $k_r \tau_{\text{a,i}} = 10^{-4}$ ,  $\tau_{\text{photoactivity}} = 15 \text{ h}$ ,  $k_c = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (**A**),  $k_c = 10^{-4.5} \text{ s}^{-1}$  (**B,C,D**). The expression adopted for  $F(t)$  in Eq. (39) is defined by Eq. (16) in Ref. [22]. In (**C**) and (**D**), the dotted lines connecting symbols are guides to the eye.

634 In **Figures 6A,B**, we replot **Figures 5A,B** in the form  $Lum(t) / (\psi \theta c_{\text{M,t}}^{*,0})$  (in  $\text{m}^{-2}$ ) versus  $t / \tau_{\text{photoactivity}}$  in  
 635 order to investigate how the signal (and its amplitude  $Lum_{\text{max}}$ ) produced by *the ensemble of bacterial cells*  
 636 are affected by the ratio  $\varphi / \varphi^*$ , with account of the  $\varphi$ -contributions stemming from *both* the convolution

637 product and its prefactor in Eq. (39). Results are first analysed for situations where passive M adsorption  
 638 on the surface of the biosensors is insignificant, i.e.  $\tilde{K}_H = 0$  or, equivalently,  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$  with  $\varepsilon_{\text{ads}}$  the  
 639 (dimensionless) passive adsorption coefficient defined by  $\varepsilon_{\text{ads}} = \tilde{K}_H S_a / V_B$ .

640 In the case  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  where the time-position  $t_{\text{max}}$  of the bioluminescence peak is independent  
 641 of  $\varphi / \varphi^*$  (cf. **Figures 5A,D**), an increase in  $\varphi / \varphi^*$  now leads to an increase in  $Lum(t) / (\psi \theta c_{M,t}^{*,0})$  (**Figure 6A**),  
 642 and at any  $t$  this increase amounts to a factor  $Lum_{\text{max}}|_{\varphi} / Lum_{\text{max}}|_{\varphi \ll \varphi^*}$  ( $>1$ ) relative to the signal at  
 643  $\varphi / \varphi^* \ll 1$ . This modification of the signal contrasts with the one discussed using the representation  
 644  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{\text{max}}|_{\varphi \ll \varphi^*}$  selected in **Figure 5A**. This is so because the quantity  $Lum(t) / (\psi \theta c_{M,t}^{*,0})$  includes the  
 645 balance between two opposite effects generated on bioluminescence when increasing cell concentration  
 646 at  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$ , namely: an increase of bulk M depletion with a resulting decrease of the signal (as specifically  
 647 analysed in **Figure 5A**), and an increase in the number of light-emitting cells with a resulting increase of  
 648 the bioluminescence, which is the dominant effect in **Figure 6A**. For  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$ , it is easily shown from  
 649 Eq. (39) that  $Lum_{\text{max}}$  scales with  $\varphi$  according to

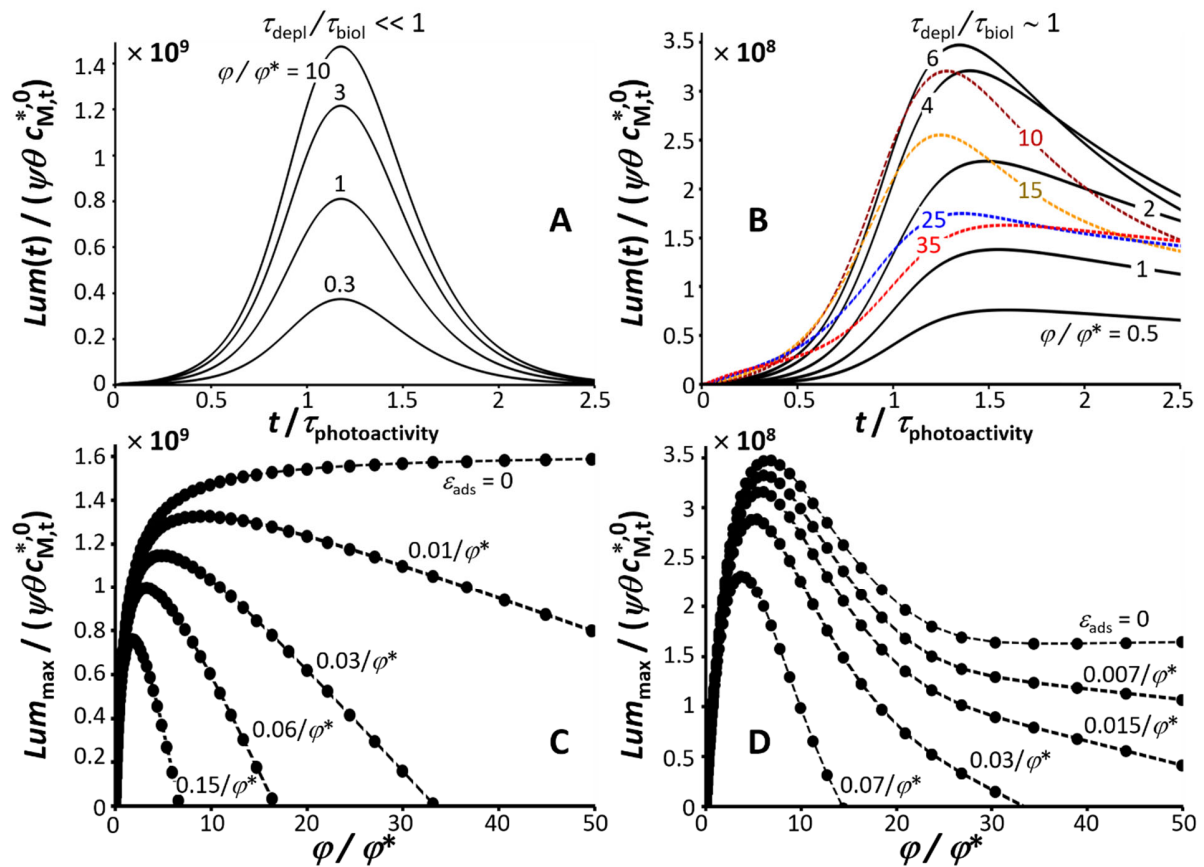
$$650 \quad Lum_{\text{max}} \sim \varphi(1 - \varepsilon_{\text{ads}}\varphi) / (1 + \varphi / \varphi^*) \quad (41)$$

651 Equation (41) makes it transparent that linearity between  $Lum_{\text{max}}$  and  $\varphi$  is conserved on the premise that  
 652  $\varphi / \varphi^* \ll 1$  and  $\varepsilon_{\text{ads}}\varphi \ll 1$ . Eq. (41) further conforms to the  $Lum_{\text{max}} / (\psi \theta c_{M,t}^{*,0})$  data provided in **Figure 6C**  
 653 for  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$ , with a linear increase of  $Lum_{\text{max}} / (\psi \theta c_{M,t}^{*,0})$  when increasing  $\varphi / \varphi^*$  in the range  $\varphi / \varphi^* \ll 1$ ,  
 654 and a plateau value (proportional to  $\varphi^*$ ) reached at  $\varphi / \varphi^* \gg 1$ . The denominator and numerator in Eq.  
 655 (41) taken in the limit  $\varepsilon_{\text{ads}}\varphi \ll 1$  capture the balance between the two opposite effects induced on the  
 656 signal when increasing cell volume fraction. This balance is obviously modified by M passive adsorption,  
 657 which is evidenced in **Figure 6C** where  $Lum_{\text{max}} / (\psi \theta c_{M,t}^{*,0})$  is reported as a function of  $\varphi / \varphi^*$  for increasing  
 658 values of  $\varepsilon_{\text{ads}}$ . In agreement with Eq. (41), **Figure 6C** shows the quadratic dependence of  $Lum_{\text{max}}$  on  $\varphi / \varphi^*$   
 659 for  $\varphi / \varphi^* \ll 1$  and sufficiently high  $\varepsilon_{\text{ads}}$ , and a linear decrease of  $Lum_{\text{max}}$  with increasing  $\varphi$  at  $\varphi / \varphi^* \gg 1$   
 660 (with slope  $-\varepsilon_{\text{ads}}\varphi^*$ ).

661 For the situation  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**Figure 6B**), the signal  $Lum(t) / (\psi \theta c_{M,t}^{*,0})$  is characterised by a shift of  
 662 the position  $t_{\text{max}}$  of the maxima with varying  $\varphi / \varphi^*$  (as explained in **Figure 5D**) and by a non-monotonous  
 663 variation of the signal maxima with increasing  $\varphi / \varphi^*$  (cf. black and colored curves in **Figure 6B**). In detail,



664 for  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$ ,  $Lum_{\text{max}}$  increases with  $\varphi / \varphi^*$ , reaches a maximum, decreases before slightly increasing to  
 665 finally reach a constant plateau value at  $\varphi / \varphi^* \gg 1$  (**Figure 6D**). The existence of such a maximum in the  
 666 representation  $Lum_{\text{max}}$  versus  $\varphi / \varphi^*$  is -together with the companion dependence of  $t_{\text{max}}$  on  $\varphi / \varphi^*$  (**Figure**  
 667 **5D**)- the signature of the significant cross-talk discussed in **Figure 5** between activation kinetics of cell  
 668 photoactivity and M depletion kinetics for  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$ . This cross-talk allows indeed cells to ‘feel’ a larger  
 669 bioavailable M fraction as compared to the situation where M depletion would be completed well before  
 670  $\bar{c}_{\text{B,p}}(t)$  starts to increase over time. At sufficiently large  $\varphi / \varphi^*$ ,  $\tau_{\text{depl}}$  becomes lower than  $\tau_{\text{biol}}$ , and the  
 671 bulk M concentration probed by the biosensors then gradually reduces to  $c_{\text{M}}^{*\infty} / c_{\text{M}}^{*0} \approx 1 / (1 + \varphi / \varphi^*)$  so that  
 672  $Lum_{\text{max}}$  then reaches the plateau value that would hold in the absence of M passive adsorption, in  
 673 agreement with **Figure 6D** and Eq. (41) taken in the limit  $\varphi / \varphi^* \gg 1$ . The slight increase of  $Lum_{\text{max}}$  with  
 674  $\varphi / \varphi^*$  (observed under the selected conditions) that just precedes the achievement of that plateau is  
 675 simply due to the increase of light-emitting cells (factor  $\varphi$  in the numerator of Eq. (41)). The introduction  
 676 of M passive adsorption decreases the maximum identified in the plot  $Lum_{\text{max}}$  versus  $\varphi / \varphi^*$  at  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$   
 677 (**Figure 6D**), and it leads to a linear decrease of  $Lum_{\text{max}}$  versus  $\varphi / \varphi^*$  at  $\varphi / \varphi^* \gg 1$  with a slope  $-\varepsilon_{\text{ads}} \varphi^*$ ,  
 678 similarly to the trend discussed in **Figure 6C** for  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$ .



**Figure 6.** (A,B) As in Figure 5A and 5B, except that bioluminescence signals are reported in the form  $Lum(t) / (\psi\theta c_{M,t}^{*,0})$  for selected values of  $\varphi / \varphi^*$  (indicated). Model parameters in (A) and (B): as in Figure 5A and 5B, respectively, with  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$ . Bioluminescence maxima under the conditions holding in (A) and (B) are collected as a function of  $\varphi / \varphi^*$  in (C) and (D), respectively. The way the dependence of these maxima on  $\varphi / \varphi^*$  is affected by passive adsorption of M at the surface of the biosensors is further illustrated in (C) and (D) where computations are given for different  $\varepsilon_{\text{ads}}$  (indicated). In (C) and (D), dotted lines are guides to the eye. Colored lines in (B) mark non-monotonous variations of  $Lum(t) / (\psi\theta c_{M,t}^{*,0})$  with changing  $\varphi / \varphi^*$ .

679  
680

### 681 3.3. Effects of ligand concentration on the bioluminescence signal $Lum(t)$ .

682 In practice, the options for tuning the bioluminescence response so as to address metal bioavailability  
683 properties are not limited to varying cell concentration but also include the possibility to change the  
684 concentration  $c_L^*$  of ligand in solution: this comes to modify the value of the dimensionless ML stability  
685 constant,  $\bar{K}_{ML} = K_{ML} c_L^*$ . Accordingly, we report in S1† (Figure S2) and Figures 7A,B the analogues of Figure  
686 5 and Figures 6A,B with bioluminescence signals that are computed for increasing values of  $\bar{K}_{ML}$  at fixed  
687 value of  $\varphi$  and  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$ . To ease interpretation, simulations of  $Lum(t) / (\psi\theta c_{M,t}^{*,0})$  in Figures 7A,B are given

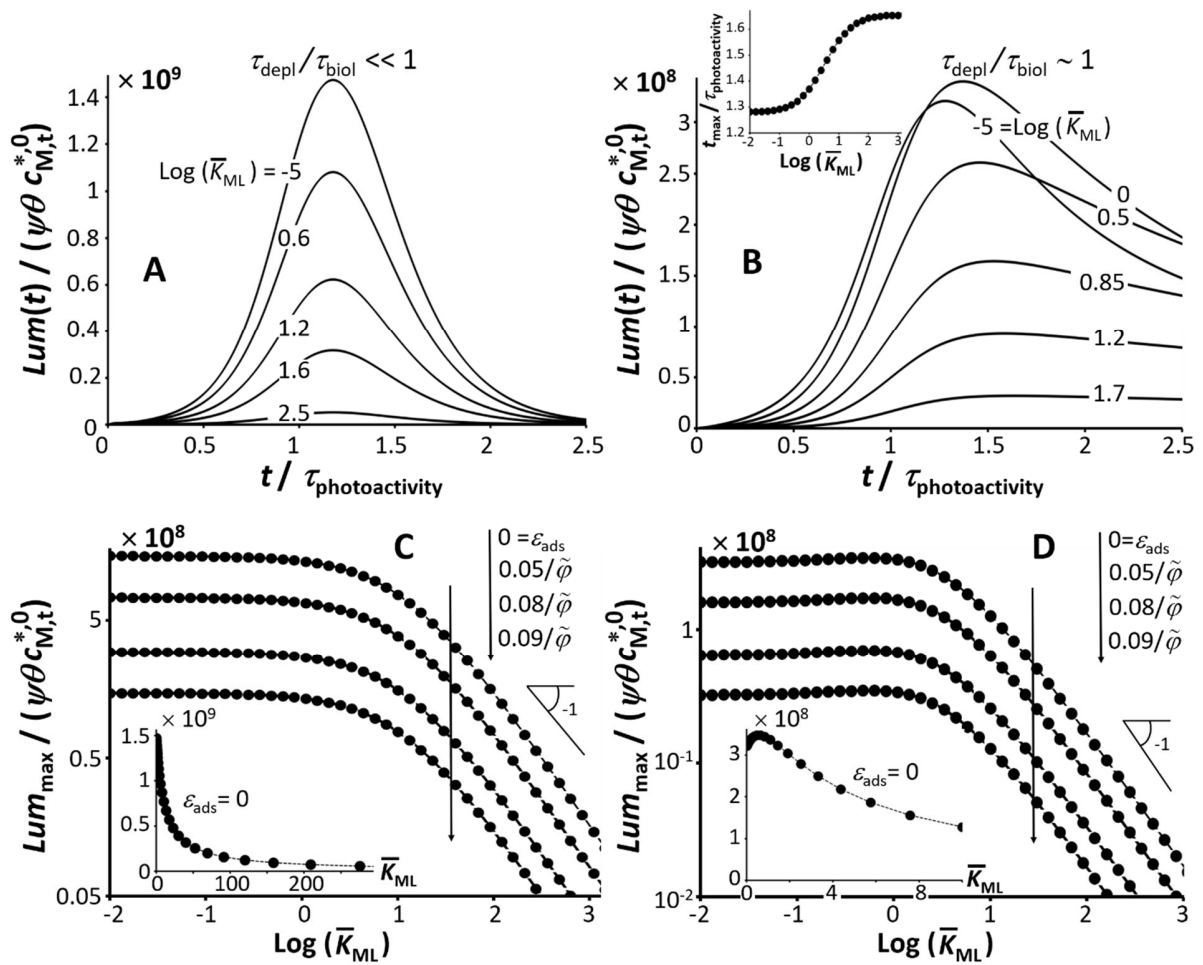
688 for ML lability  $\xi \rightarrow 0$ , which ensures that the function  $F(t)$  (and  $k_{\text{eff}}$ , Eq. (38)) involved in Eq. (39) remains  
689 unchanged with varying  $\bar{K}_{\text{ML}}$ . Briefly, for both cases  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  (**Figure 7A**) and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**Figure**  
690 **7B**), the observed modifications of the bioluminescence response with *increasing*  $\bar{K}_{\text{ML}}$  at given  $\varphi$  are  
691 qualitatively similar to those discussed in **Figures 6A** and **6B** when *decreasing*  $\varphi / \varphi^*$  at fixed  $\bar{K}_{\text{ML}}$ , and the  
692 same conclusion holds for the signals produced by a single metal-sensing cell (**Figure S2** to be compared  
693 with **Figure 5**). We observe: (i) a monotonous and non-monotonous decrease of  $Lum_{\text{max}} / (\psi\theta c_{\text{M,t}}^{*,0})$  with  
694 increasing  $\bar{K}_{\text{ML}}$  for  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  (**Figures 7A,C**) and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**Figures 7B,D**), respectively, with the  
695 apparition of a shallow maximum for  $Lum_{\text{max}} / (\psi\theta c_{\text{M,t}}^{*,0})$  versus  $\bar{K}_{\text{ML}}$  in the latter situation (**Figure 7D**), and  
696 (ii) the absence and presence of a dependence of  $t_{\text{max}}$  on  $\bar{K}_{\text{ML}}$  for  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (cf. inset  
697 **Figure 7B**), respectively. The decrease of  $Lum_{\text{max}} / (\psi\theta c_{\text{M,t}}^{*,0})$  at sufficiently high  $\bar{K}_{\text{ML}}$  for  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  is the  
698 result of the decrease in the initial free M concentration,  $c_{\text{M}}^{*,0}$ , according to  $c_{\text{M}}^{*,0} = c_{\text{M,t}}^{*,0} / (1 + \bar{K}_{\text{ML}})$  (cf. Eq.  
699 (39)). This effect of  $\bar{K}_{\text{ML}}$  dominates the increase in bioluminescence that would be observed as a result of  
700 the only ligand-mediated buffering of M depletion illustrated in **Figure 4** (cf. **Figure S2A**). For  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$   
701 , features (i) and (ii) above are again the results of the interplay between M depletion kinetics and  
702 activation kinetics of cell photoactivity. In detail, under the conditions selected in **Figure 7B**,  $t_{\text{max}}$  increases  
703 with  $\bar{K}_{\text{ML}}$  according to a sigmoid-like dependence, and it reaches a plateau value at  $\bar{K}_{\text{ML}} \gg 1$  (inset **Figure**  
704 **7B**). The evolution of  $t_{\text{max}}$  with increasing  $\bar{K}_{\text{ML}}$  from values  $\ll 1$  to  $\gg 1$  is qualitatively identical to that  
705 produced when decreasing  $\varphi$  from  $\gg 1$  to  $\ll 1$  because  $\bar{K}_{\text{ML}}$  and  $\varphi$  acts on depletion kinetics (and thus  
706 on the extent of cross-talk between depletion and cell photoactivity) in opposite ways: increasing  $\varphi$   
707 fastens depletion (cf. blue dotted curves in **Figures 5A,B**) whereas increasing  $\bar{K}_{\text{ML}}$  slows depletion down  
708 (**Figure 4A** and **Figure S2B**). This argument also explains qualitatively the mirror evolutions of  $Lum_{\text{max}}$  with  
709  $\bar{K}_{\text{ML}}$  and  $\varphi$  in **Figure 7D** and **Figure 6D**, respectively. Depending on the respective magnitudes of  $\tau_{\text{photoactivity}}$   
710 (and therewith  $\tau_{\text{biol}}$ ) and  $\tau_{\text{depl}}$ , a local minimum in the dependence of  $t_{\text{max}}$  on  $\bar{K}_{\text{ML}}$  may further exist (**Figure**  
711 **S2D**). This minimum is the pendant of the one observed in **Figure 5D** when varying  $\varphi / \varphi^*$  at fixed  $\bar{K}_{\text{ML}}$ .  
712 Quantitatively, from Eq. (39) taken in the limit  $\xi \rightarrow 0$  and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$ , we infer the following scaling of  
713  $Lum_{\text{max}}$  with  $\bar{K}_{\text{ML}}$

714 
$$Lum_{\max} \sim \varphi(1 - \varepsilon_{\text{ads}}\varphi) / \left[ (1 + \varphi / \varphi^*)(1 + \bar{K}_{\text{ML}}) \right] \quad (42)$$

715 where the expression of  $\varphi^*$  involves  $\bar{K}_{\text{ML}}$  according to Eq. (32). In agreement with Eq. (42), for  $\bar{K}_{\text{ML}} \gg 1$   
 716 the buffering of bulk M concentration by L is very efficient, M depletion becomes insignificant and  
 717  $\text{Log}(Lum_{\max})$  then decreases with slope -1 with increasing  $\text{Log}(\bar{K}_{\text{ML}})$  (Figures 7C,D). For illustration, the  
 718 dependence of  $Lum_{\max} / (\psi\theta c_{\text{M},t}^{*0})$  on  $\bar{K}_{\text{ML}}$  is shown in linear scale for  $\varepsilon_{\text{ads}} = 0$  in the insets of Figures 7C,D.  
 719 At fixed  $\bar{K}_{\text{ML}}$  and  $\varphi$ , M passive adsorption reduces  $Lum_{\max}$  (Figures 7C,D), in agreement with Eq. (42).  
 720 Interestingly, combining Eqs. (32) and (42) in the limits  $\varphi / \varphi^* \gg 1$  and  $\varepsilon_{\text{ads}}\varphi \ll 1$  leads to

721 
$$Lum_{\max} \sim \frac{a^2 k_e}{3D_M B n^{-1} 1 + \bar{K}_i} \quad (43)$$

722 , which is independent of extracellular metal speciation conditions and biosensor concentration in  
 723 solution.



**Figure 7.** Panels **(A)**, **(B)**, **(C)** and **(D)** are the analogues of Figures 6A, 6B, 6C, 6D, respectively, with the focus given here on the biosensor time-response evaluated for selected values of  $\bar{K}_{ML}$  (indicated) at constant cell volume fraction  $\varphi / \tilde{\varphi} = 10$  with  $\tilde{\varphi}$  defined by  $\tilde{\varphi} = \varphi^* / (1 + \bar{K}_{ML})$ , which is independent of  $\bar{K}_{ML}$ . Other model parameters in **(A)**, **(C)** and **(B)**, **(D)**: as in Figures 6A,C and 6B,D, respectively. Inset panel **(B)**: time-position  $t_{max} / \tau_{photoactivity}$  of the bioluminescence maxima versus  $\text{Log}(\bar{K}_{ML})$  under the conditions that hold in **(B)**. Inset panels **(C)** and **(D)**: representation of the bioluminescence maxima for  $\varepsilon_{ads} = 0$  according to linear scale in  $\bar{K}_{ML}$ . In **(B)**-**(D)**, symbols are computed data and dotted lines are guides to the eye.

724 Finally, we recall that  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  and  $\tau_{depl}$  depend on the bioavailability features of M and ML species  
725 (cf. **Table 1** and **Figures 2-4**), i.e. on  $Bn^{-1}$  and ML lability  $\xi$ . Accordingly, changes in the amplitude and  
726 apparition delay of bioluminescence maxima and/or modification of signal shape with increasing  $\varphi$   
727 and/or  $\bar{K}_{ML}$  (**Figures 5-7**) are intrinsic markers of the nature of the M biouptake flux (i.e. internalized- or  
728 diffusion-controlled), of ML inertness and -if applicable- ML lability (**Figure 2**). Observed change in the  
729 time response of the biosensors measured with varying  $\varphi$ ,  $c_L^*$  and/or nature of L, thus necessarily reflect  
730 the dependence of M biouptake flux and M depletion on  $Bn^{-1}$  and  $\xi$  (cf. discussion in §2.2.3-2.2.4), and/or  
731 the way in which  $F(t)$  varies with  $k_{eff}$  which is also function of  $Bn^{-1}$  and  $\xi$  (Eq. (38)). For the latter aspect,  
732 the reader is referred to our previous work<sup>22</sup> where we detailed how the shape of the bioluminescence  
733 signal is modulated by  $k_{eff}$  and by the dependence of cell photoactivity on time. The theory thus highlights  
734 here the benefits of systematic measurements of the time-response of luminescent biosensors as a  
735 function of *both* ligand and cell concentrations in solution in order to extract relevant information on M  
736 speciation properties and bioaccumulation kinetic features from cell signal analysis. In a coming  
737 contribution, these remarkable properties of bioluminescence signal of metal biosensors - as evidenced  
738 here by theory - will be supported by experiments on Cd-sensing *luxCDABE-Escherichia* in various metal-  
739 complexing medium conditions. Based on the theory and the defining expression of bioluminescence  
740 signal detailed here, a proper signal normalization and time-deconvolution procedure will be elaborated  
741 to *analyze quantitatively the full biosensor response measured over time* and therewith evaluate relevant  
742 metal biavailability and bioaccumulation kinetic properties.

743  
744

#### 745 **4. Conclusions and perspectives.**

746 In this work, we elaborate an original and comprehensive theory that details how the time-response  
747 of metal *lux*-bacterial sensors is determined by the dynamic partitioning of bioactive (free) metal species  
748 at the interface between biosensor and aqueous medium. This partitioning is tackled by a mechanistic  
749 formulation of the coupling between kinetics of bulk metal depletion, chemodynamics of intracellular

750 metal complexes formed with the sensing element of the metal bioreporter, and dynamics of the reactive  
751 transfer of metal species from solution to the metal-accumulating interface. Reasoning beyond the  
752 equilibrium hypothesis underlying the applicability of standard BLM modeling, this metal reactive transfer  
753 involves here the interplay between steady-state diffusion of free and complexed metal species, the  
754 kinetics of formation/dissociation of metal complexes formed with metal-binding ligands in solution, and  
755 the kinetics of metal bioaccumulation and excretion. In turn, an explicit expression is developed for the  
756 bioluminescence signal produced by metal *lux*-biosensors as a function of biosensor and metal ligand  
757 concentrations in solution, and the key biophysicochemical determinants of intra/extracellular metal  
758 speciations, metal depletion kinetics and metal bioavailability. The formalism allows the identification of  
759 the scenarios where metal biouptake is rate-limited by metal internalization (applicable in BLM) or  
760 diffusion, and the cases where metal complexes in solution are inert, dynamic, non-labile or fully labile  
761 depending on their contribution to the biouptake flux of free metal. On the basis of a set of computational  
762 examples, we then discuss how time-dependent signals generated by metal biosensors are modified with  
763 varying concentration of metal-sensing cells and extracellular metal-binding ligands. In particular, we  
764 explain why the crosstalk between speciation-dependent kinetics of bulk metal depletion and activation  
765 kinetics of cell photoactivity (connected to cell metabolism and quality/quantity of nutrients) can generate  
766 shifts in the delay of apparition of bioluminescence maxima and a non-monotonous dependence of these  
767 maxima on cell concentration, and concentration/strength of ligands in solution.

768 Overall, the conceptual framework detailed here paves the way for a promising processes-based  
769 interpretation/exploitation of metal bioreporter response over time and the evaluation of metal  
770 bioavailability features beyond the restrictive BLM foundation, i.e. with account of intertwined dynamics  
771 of extracellular *and* intracellular biophysicochemical mechanisms contributing to metal-triggered  
772 luminescence bioproduction. Obviously, extensions of the theory will be required to treat metal  
773 speciation conditions more involved than those considered here for demonstration purpose, especially  
774 for cases where e.g.: (i) metal speciation in solution is significantly controlled by different ligands, (ii)  
775 bioactive metal forms include complexed metal species, or (iii) there is competition between metal  
776 species probed by the biosensors and other ionic solution components for occupancy of the  
777 internalisation sites at the biosensor surface.<sup>41,42</sup> The theoretical scheme detailed in this work constitutes  
778 a starting basis for such future extensions. Last, we stress that the findings derived here also apply to cell  
779 signals featuring successive bioluminescence peaks over time.<sup>21,23</sup> The extent to which the positioning and  
780 amplitude of a given peak is impacted by changes of biosensor and ligand concentrations will indeed

781 depend on how fast metal depletion in solution operates as compared to the time-increase of cell  
 782 photoactivity corresponding to the mode of bioluminescence emission<sup>21</sup> at the origin of that peak.

783

784 **Glossary of main abbreviations and symbols.**

785 **Abbreviations**

786 BLM Biotic Ligand Model

787 L Metal-binding ligand in solution

788 M Free (not complexed) metal (the only bioaccumulated metal form in this work)

789 ML Metal complex formed between M and L in solution

790  $MP_{reg}$  Intracellular complex formed between M and  $P_{reg}$

791  $P_{reg}$  Metal-binding regulatory protein

792

793 **Latin**

794  $a$  Radius of the biosensor (m)

795  $Bn^{-1}$  Reciprocal of the Bosma number  $Bn$  defined by Eq. (20)

796  $c_B$  Number concentration of biosensors in solution (includes both photoactive and photoinactive cells) ( $m^{-3}$ )

797  $c_{B,p}^{max} = \theta c_B$  Maximum number concentration of photoactive cells the medium can sustain depending on available  
 798 nutrients therein ( $m^{-3}$ ), with  $0 < \theta \leq 1$

799  $c_L^*$  Bulk solution concentration of ligand L ( $mol\ m^{-3}$ )

800  $c_M^{*,0}$  Bulk solution concentration of free metal M at  $t = 0$  ( $mol\ m^{-3}$ )

801  $c_{M,t}^*$  Total bulk concentration of metal species ( $mol\ m^{-3}$ )

802  $c_M^{*,\infty}$  Bulk concentration of free metal M at equilibrium  $t \rightarrow \infty$  ( $mol\ m^{-3}$ )

803  $c_{i=M,L,ML}(r,t)$  Concentrations of M, L, ML species at position  $r$  and time  $t$  ( $mol\ m^{-3}$ )

804  $c_{i=M,ML}^*(t)$  Bulk concentrations of M and ML at  $t$  ( $mol\ m^{-3}$ )

805  $\bar{c}_{i=M,ML}(r,t)$  Dimensionless concentrations of M and ML at position  $r$  and time  $t$  defined by  $\frac{c_{i=M,ML}(r,t)}{c_{i=M,ML}^*(t)}$

806  $\bar{c}_{B,p}(t)$  Dimensionless concentration of photoactive cells at time  $t$

807  $c_M^a(t)$  Surface concentration of free M at time  $t$  ( $mol\ m^{-3}$ )

808  $D_{i=M,L,ML}$  Diffusion coefficients of M, L and ML in solution ( $m^2\ s^{-1}$ )

809  $f_{a,M}$  Dimensionless scalar defined by Eq. (21)

810  $F(t)$  Dimensionless function involved in the convolution product of Eqs. (37),(39)

811  $J_e(t)$  M excretion flux at time  $t$  ( $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ )

812  $J_u(t)$  M biouptake flux at time  $t$  ( $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ )

813  $J_M(t)$  Supply flux of M at time  $t$  ( $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ )

814  $k_a, k_d$  Kinetic constants for ML formation ( $m^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ ) and dissociation ( $s^{-1}$ ) in solution, respectively

815  $k_{a,i}^*, k_{d,i}^*$  Kinetic constants for intracellular  $MP_{reg}$  formation ( $m^3\ mol^{-1}\ s^{-1}$ ) and dissociation ( $s^{-1}$ ), respectively

816  $k_e$  Kinetic constant for M excretion ( $s^{-1}$ )

817  $k_{eff}$  Effective kinetic constant defined below Eq. (38) ( $s^{-1}$ )

818  $k_{int}$  Internalization kinetic constant ( $s^{-1}$ )

819  $k_i$  Effective kinetic constant associated with the inhibition of luciferase production and/or activity ( $s^{-1}$ )

820  $K_H$  Henry constant for adsorption of M on the internalisation sites at the biosensor surface (m)

- 821  $\tilde{K}_H$  Henry constant for passive adsorption of M at the biosensor surface (m)
- 822  $K_{Hi}$  Hill constant that relates to the affinity of the promoter for the  $MP_{reg}$  complex (mol m<sup>-3</sup>)
- 823  $\bar{K}_i = \tau_{d,i} / \tau_{a,i}$  Dimensionless stability constant for intracellular  $MP_{reg}$  complex
- 824  $K_{ML}$  ML stability constant (m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>)
- 825  $\bar{K}_{ML}$  Dimensionless ML stability constant defined by  $\bar{K}_{ML} = K_{ML} c_L^*$
- 826  $Lum^{(0)}(t, x, y)$  Bioluminescence (counts s<sup>-1</sup>) at time  $t$  in the absence of bulk M depletion under conditions where
- 827 bulk M concentration is  $x$  and (time-dependent) cell photoactivity is  $y$  Eq. (37)
- 828  $Lum(t)$  Bioluminescence at time  $t$  with account of bulk M depletion (counts s<sup>-1</sup>) (Eq. (39))
- 829  $Lum_{max}$  Maximum of the time-dependent bioluminescence signal  $Lum(t)$  (counts s<sup>-1</sup>)
- 830  $\overline{Lum}(t)$  Bioluminescence (counts s<sup>-1</sup> m<sup>3</sup>) at time  $t$  defined by  $Lum(t) / [c_B (1 - \tilde{K}_H S_a c_B)]$
- 831  $\overline{Lum}_{max} / \overline{Lum}_{max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  Dimensionless ratio between maxima of  $\overline{Lum}(t)$  evaluated with and without account of
- 832 bulk M depletion
- 833  $p_{ML}$  Dimensionless scalar defined by  $p_{ML} = p_o / (1 - \varphi^{1/3})$
- 834  $p_o$  Dimensionless scalar defined by  $p_o = 1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi$
- 835  $r_c$  Radius of Kuwabara cell defined by  $r_c = a \varphi^{-1/3}$
- 836  $S_a$  Surface area of a biosensor (m<sup>2</sup>)
- 837  $t$  Time (s)
- 838  $\bar{t} = t / \tau_{a,i}$  Dimensionless time after scaling of  $t$  by  $\tau_{a,i}$
- 839  $V_B$  Volume of a biosensor (m<sup>3</sup>)
- 840
- 841 **Greek**
- 842  $\varepsilon$  Ratio defined by  $\varepsilon = D_{ML} / D_M$
- 843  $\varepsilon_{ads}$  Dimensionless number for passive adsorption of M at the biosensor surface defined by  $\varepsilon_{ads} = \tilde{K}_H S_a / V_B$
- 844  $\zeta$  Dimensionless scalar defined by Eq. (18)
- 845  $\bar{\kappa}_a$  (Dimensionless) Damköhler number for the rate constant of ML formation defined by  $\bar{\kappa}_a = k_a c_L^* a^2 / D_M$
- 846  $\lambda_o$  Dimensionless scalar defined by Eq. (19)
- 847  $\mu_o$  Reaction layer thickness defined by  $\mu_o = \sqrt{D_M / (k_a c_L^*)}$  (m)
- 848  $\xi$  ML lability parameter defined by Eq. (6) (no dimension)
- 849  $\rho_s$  Concentration of metal-binding sites carried by  $P_{reg}$  and smeared-out over the volume of a biosensor (mol m<sup>-3</sup>)
- 850  $\tau_{a,i}$  Time constant for the formation of intracellular  $MP_{reg}$  defined by  $\tau_{a,i} = 1 / (k_{a,i}^* \rho_s)$  (s)
- 851  $\tau_{d,i}$  Time constant for the dissociation of intracellular  $MP_{reg}$  defined by  $\tau_{d,i} = 1 / k_{d,i}^*$  (s)
- 852  $\tau_{biol}$  Timescale marking the onset of increase of  $\bar{c}_{B,p}(t)$  with time (s)
- 853  $\tau_{depl}$  Time constant for bulk depletion of M (s) for cases where  $c_M^*(t)$  decreases with  $t$  according to a mono-
- 854 exponential law (Eq. (25))
- 855  $\tau_o$  Timescale for transferring M from bulk solution to the intracellular cell volume prior to intracellular sequestration
- 856 of M by  $P_{reg}$  (s)
- 857  $\bar{\tau}_o$  Dimensionless timescale defined by  $\bar{\tau}_o = \tau_o / \tau_{a,i}$
- 858  $\tau_{photoactivity}$  Time where  $\bar{c}_{B,p}(t)$  features an inflexion point (s)
- 859  $\tau_{SS}$  Timescale for steady-state M diffusion from solution to biosensor surface defined by  $\tau_{SS} = a^2 / D_M$  (s)



860  $\tau_{\pm} = \tau_{a,i} \bar{\omega}_{\pm}^{-1}$  Time constants for bulk M depletion referring to the short- and long-terms depletion components ( $\tau_{+}$   
861 and  $\tau_{-}$ , respectively) (Eq. (14))  
862  $\varphi$  Biosensor volume fraction related to  $c_B$  by  $\varphi = c_B V_B$   
863  $\varphi^*$  Critical cell volume fraction defined by Eq. (32)  
864  $\tilde{\varphi}$  Defined by  $\tilde{\varphi} = \varphi^* / (1 + \bar{K}_{ML})$   
865  $\phi_c(t)$  Concentration of intracellular metal complex  $MP_{reg}$  at time  $t$  per microorganism surface area ( $\text{mol m}^{-2}$ )  
866  $\phi_M(t)$  Concentration of intracellular free M at time  $t$  per microorganism surface area ( $\text{mol m}^{-2}$ )  
867  $\psi$  Parameter involved in the defining expression of the time-dependent bioluminescence signal (Eqs. (37),(39))  
868 ( $\text{counts s}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{m}^5$ )  
869  $\bar{\omega}_{\pm}$  Dimensionless frequencies associated to the short- and long-term kinetics of bulk M depletion (Eq. (16))  
870  
871

## 872 Data availability

873 The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable  
874 request.

875

## 876 Conflicts of interest

877 There are no conflicts of interest to declare.

878

## 879 Acknowledgements

880 J.F.L.D. is grateful to French national EC2CO program and OTELo (Observatoire Terre Environnement Lorraine) for  
881 financial support: Programs EC2CO MENABIOL and AAP Interdisciplinaire OTELo 2020. J.F.L.D. is grateful to Lorraine  
882 Université d'Excellence LUE (Program BioCEL) for funding the PhD thesis of L.M.

883

## 884 † Supplementary Information (SI) available

885 Full expression (Eq. (S1)) of the (dimensionless) quantity  $f_{a,M}$  involved in Eqs. (17) and (19), and for which the limit  
886 at  $\varphi \ll 1$  leads to Eq. (21). Defining expressions for the concentrations of intracellular free metal  $\phi_M(t)$  (Eq. (S2)),  
887 intracellular  $MP_{reg}$  complex  $\phi_c(t)$  (Eq. (S3)) and for the equilibrium concentration of free metal at the surface of a  
888 biosensor,  $c_M^a(t \rightarrow \infty) = c_M^{a,\infty}$  (Eq. (S5)). Supplementary figure (Figure S1) illustrating how bulk metal depletion  
889 modifies bioluminescence signal, using the expression that decomposes the signal into the two components defined  
890 by Eq. (40). Supplementary figure (Figure S2) reporting the analogue of Figure 5 for analysing the variations of the  
891 dimensionless bioluminescence signal  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{max} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  as a function of the dimensionless stability constant

892  $\bar{K}_{ML}$  of extracellular ML complex.

893

894

## 895 References.

- 896 [1] A. Tessier, R. Turner, (1995) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, IUPAC Series on  
897 Analytical Chemistry of Environmental Systems. John Wilend and Sons.  
898 [2] H. E. Allen, R. H. Hall, T. D. Brisbin. Metal speciation. Effects on aquatic toxicity. *Environ. Sci. Technol.*,  
899 1980, **14**, 441-443.  
900 [3] C. J. Milne, D. G. Kinniburgh, W. H. van Riemsdijk, E. Tipping. Generic NICA-Donnan model parameters  
901 for metal-ion binding by humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 958-971.  
902 [4] E. Tipping. WHAMC-A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils  
903 incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Computers &*  
904 *Geosciences*, 1994, **20**, 973-1023.

905 [5] R. M. Town, van H. P. Leeuwen, J.F.L. Duval. Rigorous physicochemical framework for metal ion binding  
906 by aqueous nanoparticulate humic substances: implications for speciation modeling by the NICA-Donnan  
907 and WHAM codes. *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 8516-8532.

908 [6] <https://vminteq.com/>

909 [7] S. Niyogi, C. M. Wood. Biotic Ligand Model, a Flexible Tool for Developing Site-Specific Water Quality  
910 Guidelines for Metals. *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 23, 6177-6192.

911 [8] V. Slaveykova, K. Wilkinson. Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical  
912 review of the biotic ligand model. *Environ. Chem.*, 2005, **2**, 9-24.

913 [9] H. P. van Leeuwen, R. M. Town, J. Buffle, R. F. M. J. Cleven, W. Davison, J. Puy, W. H. van Riemsdijk, L.  
914 Sigg. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.*,  
915 2005, **39**, 22, 8545-8556.

916 [10] K. J. Wilkinson and J. Buffle, in *Physicochemical kinetics and transport at biointerfaces*, ed. H. P. van  
917 Leeuwen and W. Köster, John Wiley & Sons, Chichester, 2004, chapter 10, p. 445.

918 [11] H. P. van Leeuwen, Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environ.*  
919 *Sci. Technol.* 1999, **33**, 3743-3748.

920 [12] J. F. L. Duval, E. Rotureau. Dynamics of metal uptake by charged soft biointerphases: impacts of  
921 depletion, internalisation, adsorption and excretion. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 7401.

922 [13] J. F. L. Duval, H. P. van Leeuwen, R. M. Town. Electrostatic effects on ligand-assisted transfer of metals  
923 to (bio)accumulating interfaces and metal complexes (bioavail)ability. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng.*  
924 *Asp.*, 2023, **658**, 130679.

925 [14] H. P. van Leeuwen, J. F. L. Duval, J. P. Pinheiro, R. Blust, R. M. Town. Chemodynamics and  
926 bioavailability of metal ion complexes with nanoparticles in aqueous media. *Environ. Sci.: Nano.*, 2017, **4**,  
927 2108-2133.

928 [15] J. P. Pinheiro, J. Galceran, H. P. van Leeuwen. Metal speciation dynamics and bioavailability: bulk  
929 depletion effects. *Environ. Sci. Technol.*, 2004, **38**, 2397-2405.

930 [16] E. Rotureau, P. Billard, J. F. L. Duval. Evaluation of metal biouptake from the analysis of bulk metal  
931 depletion kinetics at various cell concentrations: theory and application. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**,  
932 990-998.

933 [17] J. F. L. Duval. Dynamics of metal uptake by charged biointerphases: bioavailability and bulk depletion.  
934 *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7873-7888.

935 [18] R. M. Présent, E. Rotureau, P. Billard, C. Pagnout, B. Sohm, J. Flayac, R. Gley, J. P. Pinheiro, J. F. L.  
936 Duval. Impact of intracellular metallothionein on metal biouptake and partitioning dynamics at bacterial  
937 interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 29114-29124.

938 [19] J. F. L. Duval, R. M. Présent, E. Rotureau. Kinetic and thermodynamic determinants of trace metal  
939 partitioning at biointerphases: the role of intracellular speciation dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.*,  
940 2016, **18**, 30415-30435.

941 [20] J. R. van der Meer, S. Belkin. Where microbiology meets microengineering: Design and applications  
942 of reporter bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, **8**, 511-522.

943 [21] E. Delatour, C. Pagnout, M. Zaffino, J. F. L. Duval. Exploiting catabolite repression and stringent  
944 response to control delay and multimodality of bioluminescence signal by metal whole-cell biosensors:  
945 interplay between metal bioavailability and nutritional medium conditions. *Biosensors*, 2022, **12**, 327.

946 [22] J. F. L. Duval, C. Pagnout. Decoding the time-dependent response of bioluminescent metal-detecting  
947 whole-cell bacterial sensors. *ACS Sensors*, 2019, **4**, 1373-1383.

948 [23] J. F. L. Duval, C. Pagnout. Bimodal stringence-mediated response of metal-detecting luminescent  
949 whole cell bioreporters: experimental evidence and quantitative theory. *Sens. Actuators B: Chemical*,  
950 2020, **309**, 127751.

951 [24] R. Tecon, J. van der Meer. Bacterial biosensors for measuring availability of environmental pollutants.  
952 *Sensors*, 2008, **8**, 4062-4080.

953 [25] B. Li, X. Zhang, B. Tefsen, M. Wells. From speciation to toxicity: Using a “Two-in-One” whole-cell  
954 bioreporter approach to assess harmful effects of Cd and Pb. *Water Res.*, 2022, **217**, 118384.  
955 [26] Y. Zhu, E. Elcin, M. Jiang, B. Li, H. Wang, X. Zhang, Z. Wang. Use of whole-cell bioreporters to assess  
956 bioavailability of contaminants in aquatic systems. *Front. Chem.*, 2022, **10**, 1018124  
957 [27] M. Eigen, R. G. Wilkins. Mechanisms of Inorganic Reactions. In: Advances in Chemistry Series. Nr. 49,  
958 1965, S. 55. American Chemical Society, Washington, D. C.  
959 [28] R. M. Fuoss. Ionic Association. III. The Equilibrium between Ion Pairs and Free Ions. *J. Am. Chem. Soc.*,  
960 1958, **80**, 5059-5061.  
961 [29] M. Eigen. Über die Kinetik sehr Schnell Verlaufender Ionenreaktionen in Wasseriger Lösung. *Z. Phys.*  
962 *Chem.* (Frankfurt am Main) 1954, **1**, 176.  
963 [30] R. Hajdu, J. P. Pinheiro, J. Galceran, V. Slaveykova. Modeling of Cd Uptake and Efflux Kinetics in Metal-  
964 Resistant Bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, **44**, 12, 4597-4602.  
965 [31] D. H. Nies. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003, **27**,  
966 313-339.  
967 [32] N. Mirimanoff, K. J. Wilkinson. Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive  
968 bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 616-622.  
969 [33] H. P. van Leeuwen, J. Buffle, J. F. L. Duval, R. M. Town. Understanding the extraordinary ionic reactivity  
970 of aqueous nanoparticles. *Langmuir*, 2013, **29**, 10297-10302.  
971 [34] J. F. L. Duval. Chemodynamics of metal ion complexation by charged nanoparticles: a dimensionless  
972 rationale for soft, core-shell and hard particle types. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 11802.  
973 [35] J. Galceran, J. Puy, J. Salvador, J. Cecilia, H. P. van Leeuwen. Voltammetric lability of metal complexes  
974 at spherical microelectrodes with various radii. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **505**, 85-94.  
975 [36] Z. Zhang, D. Alemani, J. Buffle, R.M. Town, K.J. Wilkinson. Metal flux through consuming interfaces in  
976 ligand mixtures: boundary conditions do not influence lability and relative contributions of metal species.  
977 *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 17606-17614.  
978 [37] L. Michaelis, M.L. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z.*, 1913, **49**, 333-369.  
979 [38] T. N. P. Bosma, P. J. M. Middeldorp, G. Schraa, A. J. B. Zhender. Mass transfer limitation of  
980 biotransformation: quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31**, 248-252.  
981 [39] J. Membrez, P.P. Infelta, A. Renken. Use of the Laplace transform technique for simple kinetic  
982 parameters evaluation. Application to the adsorption of a protein on porous beads. *Chem. Engin. Sci.*,  
983 1996, **51**, 4489-4498.  
984 [40] C. Pagnout, R. M. Présent, P. Billard, E. Rotureau, J. F. L. Duval. What do luminescent bacterial metal-  
985 sensors probe? Insights from confrontation between experiments and flux-based theory. *Sens. Actuators*  
986 *B: Chemical*, 2018, **270**, 482-491.  
987 [41] G. Yang, Q.-G. Tan, L. Zhu, K. J. Wilkinson. The role of complexation and competition in the biouptake  
988 of europium by a unicellular alga. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2014, **33**, 2609-2615.  
989 [42] B. A. Eijkelkamp, J. R. Morey, M. P. Ween, Ong C-IY, A. G. McEwan, J. C. Paton, C. A. McDevitt.  
990 Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress  
991 management in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE*, 2014, **9**, e89427.  
992  
993  
994  
995  
996

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Biophysicochemical kinetics of metal detection by luminescence-based whole-cell biosensors: connecting biosensor response to metal bioavailability, speciation and cell metabolism.

Jérôme F.L. Duval,<sup>1,\*</sup> Lorenzo Maffei,<sup>2</sup> Eva Delatour,<sup>2</sup> Marie Zaffino,<sup>2</sup> Christophe Pagnout<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, France.

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, France.

\* Corresponding author (jerome.duval@univ-lorraine.fr).

This document contains 5 supplementary equations and 2 supplementary figures.

#### I. Supplementary equations.

The complete expression of  $f_{a,M}$  involved in Eqs. (17) and (19) that define the time constant  $\tau_o$  and the scalar  $\lambda_o$ , respectively, reads after algebraic arrangements as

$$f_{a,M} = \frac{3\varphi}{1-\varphi} \frac{\bar{h}_a^{-2} \frac{\bar{K}_{ML}}{1+\bar{K}_{ML}} (1-\varepsilon) [\bar{h}_a (\varphi^{-1/3} \operatorname{sech}(\sigma) - 1) + \tanh(\sigma)] + \frac{1}{6} (1-\varphi^{-1/3})^2 (1+2\varphi^{1/3}) (\bar{h}_a - \tanh(\sigma))}{\bar{h}_a (1-\varphi^{1/3}) - (1-\varphi^{1/3} + \varepsilon \bar{K}_{ML}) \tanh(\sigma)} \quad (S1)$$

where  $\sigma$  is given by  $\sigma = \bar{h}_a (1 - \varphi^{-1/3})$  and  $\bar{h}_a$  is provided by Eq. (4) in the main text. It is verified that Eq. (S1) in the limit  $\varphi \ll 1$  reduces to Eq. (21) written in terms of the ML lability parameter  $\xi$  (Eq. (6)).

Given the expression defining  $c_M^*(t)$  (Eq. (14) in the main text) and obtained after arrangements and Laplace transform of Eqs. (9)-(13), the dependence of the intracellular concentration of free M at  $t$ ,  $\phi_M(t)$ , can be evaluated, and the result after algebraic manipulations reads as

$$\phi_M(t) = \frac{K_H k_{int} \tau_{a,i} c_M^{*,0}}{1 + (p_{ML} Bn)^{-1}} \left[ \frac{e^{-\frac{1+\bar{K}_i}{\bar{K}_i} \bar{\tau}}}{\bar{\omega}_- - \bar{\omega}_+} \sum_{n=\pm} \delta_n \left( 1 - \frac{1}{\bar{\omega}_n \bar{K}_i} \right) \left( e^{\left( \frac{1+\bar{K}_i}{\bar{K}_i} - \bar{\omega}_n \right) \bar{\tau}} - 1 \right) + \frac{\bar{\tau}_o}{\zeta + \bar{K}_i} \left( 1 - e^{-\frac{1+\bar{K}_i}{\bar{K}_i} \bar{\tau}} \right) \right] \quad (S2)$$

where  $\delta_n = 1$  for  $n \equiv +$  and  $\delta_n = -1$  for  $n \equiv -$ , and  $Bn$ ,  $\bar{\tau}_o = \tau_o / \tau_{a,i}$ ,  $\zeta$  and  $\bar{\omega}_\pm$  are given by Eqs. (20), (17), (18) and (16), respectively, and  $p_{ML} \approx p_o = 1 + \varepsilon \bar{K}_{ML} \xi$  for  $\varphi \ll 1$  (cf. below Eq. (5)). Combining Eqs. (12) and (S2), the time-dependent concentration of intracellular  $MP_{reg}$  complex,  $\phi_c(t)$ , can be written in the form

$$\phi_c(t) = \bar{K}_i \frac{K_H k_{int} \tau_{a,i} c_M^{*,0}}{1 + (p_{ML} Bn)^{-1}} \left[ \frac{\bar{\tau}_o}{\zeta + \bar{K}_i} - \frac{1}{\bar{K}_i} \frac{1}{\bar{\omega}_- - \bar{\omega}_+} \sum_{n=\pm} \delta_n (\bar{\omega}_n)^{-1} e^{-\bar{\omega}_n \bar{\tau}} \right] \quad (S3)$$

From Eqs. (S2) and (S3), we infer that the concentrations of intracellular M and  $MP_{\text{reg}}$  complexes at  $t \rightarrow \infty$ , denoted as  $\phi_M^\infty$  and  $\phi_c^\infty$ , respectively, are interrelated by the equilibrium expression

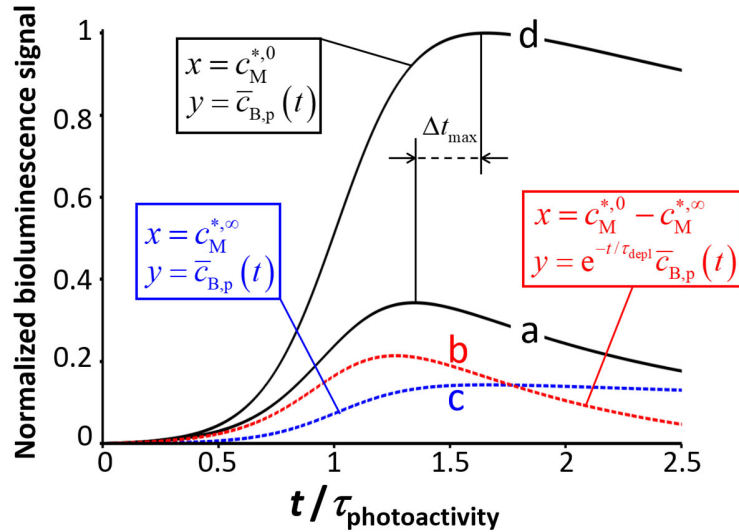
$$\phi_M^\infty = \phi_c^\infty / \bar{K}_i = \frac{K_H k_{\text{int}} \tau_o c_M^{*,0}}{\left[ \left( 1 + (p_{\text{ML}} Bn)^{-1} \right) (\zeta + \bar{K}_i) \right]} \quad (\text{S4})$$

Finally, solution of Eqs. (9)-(13) leads to the following expression of the M surface concentration at equilibrium,  $c_M^a(t \rightarrow \infty) = c_M^{a,\infty}$ ,

$$c_M^{a,\infty} / c_M^{*,0} = \frac{1}{1 + (p_{\text{ML}} Bn)^{-1}} \left( c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0} + \frac{k_e \tau_o (p_{\text{ML}} Bn)^{-1}}{\left[ 1 + (p_{\text{ML}} Bn)^{-1} \right] (\zeta + \bar{K}_i)} \right) \quad (\text{S5})$$

where  $c_M^{*,\infty} / c_M^{*,0}$  is defined by Eq. (22).

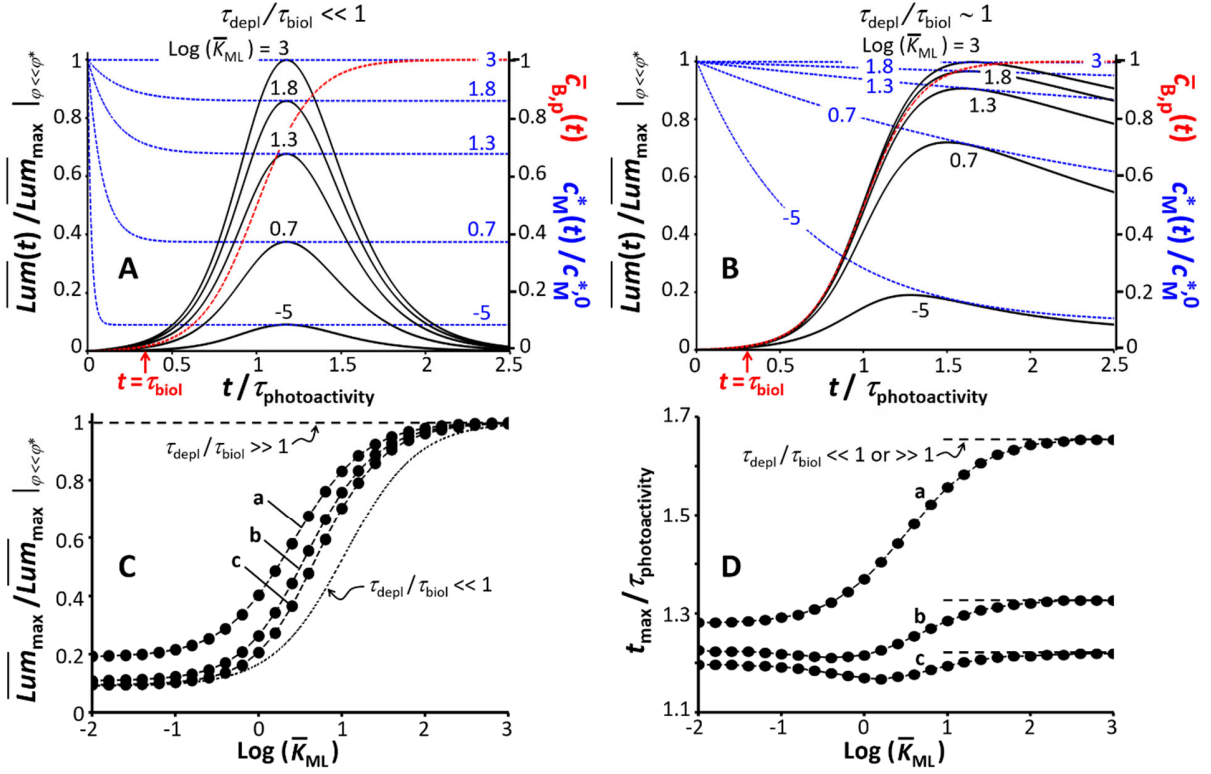
## II. Supplementary Figures.



**Figure S1.** Illustration of the decomposition of the bioluminescence signal with account of metal depletion in bulk solution (curve (a)) on the basis of the two terms defined by Eq. (40) in the main text (curves (b) and (c)). Accordingly, the signal corresponding to curve (a) is the sum of the signals pictured by curves (b) and (c). Curve (d) represents the signal obtained without considering the effects of bulk metal depletion. All signals are here normalized by the maximum of bioluminescence reached in the absence of bulk M depletion. The time axis is scaled by  $\tau_{\text{photoactivity}}$  which is the time at which the (dimensionless) concentration of photoactive cells,  $\bar{c}_{\text{B,p}}(t)$ , features an inflexion point (cf. main text for details and Figure 5A, red curve therein). The (dummy) variables  $x$  and  $y$  are those defined below Eq. (40), and they specify which bulk M concentration is applicable for computing the signals (b), (c) and (d) (variable  $x$ ) and which expression of the concentration of photoactive cells is relevant to each signal (variable  $y$ ).  $\Delta t_{\text{max}}$  represents the shift in position of the bioluminescence maximum as a result of bulk M depletion. Using the notations detailed in the main text (cf. Eq. (40)), curves (a), (c), (b) and (d) correspond to

$$\overline{\text{Lum}}(t) / \overline{\text{Lum}}_{\text{max}} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}, \quad \overline{\text{Lum}}^{(0)}(t, c_M^{*,\infty}, \bar{c}_{\text{B,p}}(t)) / \overline{\text{Lum}}_{\text{max}} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*},$$

$\overline{Lum}^{(0)}(t, c_M^{*,0} - c_M^{*,\infty}, e^{-t/\tau_{\text{depl}}}\bar{c}_{B,p}(t)) / \overline{Lum}_{\text{max}} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  and  $\overline{Lum}(t) \Big|_{\varphi \ll \varphi^*} / \overline{Lum}_{\text{max}} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$ , respectively, where  $\overline{Lum}(t) = Lum(t) / [c_B(1 - \tilde{K}_H S_a c_B)]$  and  $\overline{Lum}^{(0)}(t, x, y) = Lum^{(0)}(t, x, y) / [c_B(1 - \tilde{K}_H S_a c_B)]$ . Figure S1 holds for  $\varphi / \varphi^* = 6$  with the model parameters adopted in Figure 5B of the main text.



**Figure S2.** Illustrations of the dependence of the dimensionless bioluminescence signal  $\overline{Lum}(t) / \overline{Lum}_{\text{max}} \Big|_{\varphi \ll \varphi^*}$  (evaluated from Eq. (39)) on time for different dimensionless ML stability constants  $\bar{K}_{ML}$  (indicated) for the situations  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  (**A**) and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$  (**B**).  $\tau_{\text{depl}}$  is the timescale for depletion of bulk M concentration and  $\tau_{\text{biol}}$  marks the onset of the increase in the concentration of photoactive cells  $\bar{c}_{B,p}(t)$  with time (red dotted curves). The time axis is scaled by  $\tau_{\text{photoactivity}}$  which is the time at which  $\bar{c}_{B,p}(t)$  features an inflexion point. Blue dotted curves represent the time-dependent (dimensionless) bulk M concentration,  $c_M^*(t) / c_M^{*,0}$ , for each selected value of  $\bar{K}_{ML}$  (Eqs. (14)-(22) or, equivalently, Eq. (25) under the conditions adopted in this figure). The (dimensionless) maxima of the bioluminescence signals and their time-positions  $t_{\text{max}} / \tau_{\text{photoactivity}}$  under the conditions in (**B**) (where  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \sim 1$ ) are reported in (**C**) and (**D**), respectively. We further provide in (**C**) and (**D**) the signal maxima and associated  $t_{\text{max}} / \tau_{\text{photoactivity}}$ , respectively, as a function of  $\bar{K}_{ML}$  in the extremes  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \ll 1$  and  $\tau_{\text{depl}} / \tau_{\text{biol}} \gg 1$  for the conditions that hold in (**B**) (indicated). Unless otherwise specified in the figure, adopted model parameters are:  $\varphi / \tilde{\varphi} = 10$  with  $\tilde{\varphi} = \varphi^* / (1 + \bar{K}_{ML})$  ( $\tilde{\varphi}$  is independent of  $\bar{K}_{ML}$ ),  $\varepsilon = 1$ ,  $a = 1 \mu\text{m}$ ,  $D_M = 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $Bn^{-1} = 0.1$ ,  $\xi \rightarrow 0$ ,  $\bar{K}_i = 10$ ,  $\tau_{a,i} = 0.1 \text{ s}$ ,  $k_i \tau_{a,i} = 10^{-4}$ ,  $k_e = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (**A**),

$k_e = 10^{-4.5} \text{ s}^{-1}$  (**B,C,D**),  $\tau_{\text{photoactivity}} = 15 \text{ h}$  in (**A**), (**B**), (**C**) (curve (a)) and (**D**) (curve (a)),  $\tau_{\text{photoactivity}} = 30 \text{ h}$  for curves (b) in (**C**) and (**D**),  $\tau_{\text{photoactivity}} = 45 \text{ h}$  for curves (c) in (**C**) and (**D**). The expression adopted for  $F(t)$  in Eq. (39) correspond to Eq. (16) in Ref. [22]. In (**C**) and (**D**), dotted lines connecting symbols are guides to the eye.

## *Conclusions et perspectives*



Depuis plusieurs décennies, la communauté scientifique s'efforce de mettre au point des méthodes robustes permettant un suivi précis des concentrations de métaux dans les échantillons environnementaux, tout en évaluant de manière appropriée leur toxicité. Dans cette optique, l'utilisation de biosenseurs bactériens émettant un signal de bioluminescence après avoir internalisé des ions métalliques ciblés, a été envisagée comme une solution prometteuse pour atteindre ces deux objectifs. Néanmoins, la complexité des processus biologiques et physico-chimiques intra- et extra-cellulaires qui régissent la dynamique temporelle du signal complique l'établissement d'une formulation mathématique décrivant comment le signal d'un biosenseur évolue dans le temps en fonction de la qualité nutritive du milieu et de la biodisponibilité/spéciation des espèces métalliques en solution.

Ainsi, les objectifs inscrits dans cette thèse, ont consisté à étendre le cadre conceptuel établi par **Duval & Pagnout, (2019, 2020)** en intégrant d'une part la qualité nutritive du milieu et d'autre part les processus dynamiques qui régissent la répartition des métaux de la solution à la membrane biologique, lesquels déterminent la labilité des complexes métalliques et leur contribution au flux de bioaccumulation. Les objectifs de cette thèse étaient principalement de déterminer en détails de quelle manière le signal temporel de bioluminescence est impacté par la qualité nutritive du milieu, et comment la biodisponibilité et spéciation des métaux en solution peuvent se 'lire' dans le signal temporel de bioluminescence.

Pour répondre au premier objectif, à savoir, de quelle manière la qualité nutritive impacte la signal temporel de bioluminescence, nous avons exploité deux mécanismes de régulation globale permettant aux bactéries de s'adapter rapidement à un changement de leur milieu environnant : la *réponse stringente* (réponse précédemment étudiée par **Duval & Pagnout, (2020)**) et la *répression catabolique*. Nous avons étudié la réponse temporelle de bioluminescence sur 48 h du biosenseur *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductible au Cd(II), dans des milieux dont la composition diffère en source d'acides aminés (tryptone ou Lysogeny Broth (LB)), en source de carbone (glucose, xylose et leurs mélanges) et en concentrations de Cd(II). Nous avons montré que le couplage de la *réponse stringente* et de la *répression catabolique* médiée par le glucose et le xylose conduit à l'apparition de plusieurs pics successifs au cours du temps. La modulation de ce couplage, réalisée en ajustant les concentrations en acides aminés (ainsi que leur source), et les concentrations en glucose et en xylose, permet de définir de manière précise le nombre de pics de bioluminescence pouvant aller de 1 à 4, et dont la hauteur (l'intensité de luminescence) est proportionnelle à la concentration totale de Cd(II) en solution. Les modulations déterminent également le délai d'apparition et la forme et l'amplitude des pics et permettent d'apprécier les voies métaboliques opérantes qui correspondent à ces différents pics. En outre, ces modulations du signal permettent d'ajuster la plage temporelle de détection et de quantification de quelques heures (système à un pic) à plusieurs jours (système à deux, trois ou quatre

pics) ainsi que les performances des biosenseurs (*i.e.* la concentration minimale de Cd(II) pouvant induire la luminescence est réduite). Néanmoins, la concentration minimale en Cd(II) pour induire la luminescence augmente avec l'augmentation du nombre de pics de bioluminescence. Ceci s'explique par une diminution de la concentration en métaux dans le milieu au cours du temps via la biosorption, la bioaccumulation et la complexation des métaux avec des éléments présents dans le milieu (sels, nutriments). De plus, en nous appuyant sur la récente théorie de **Duval & Pagnout, (2020)**, nous sommes parvenus à reconstruire avec succès les signaux de bioluminescence pour toutes les conditions examinées. Le formalisme théorique a notamment mis en évidence que la modulation de la bioluminescence ne résultait pas seulement de la biodisponibilité et qualité des nutriments mais également de leurs interactions avec les métaux biodisponibles présents dans le milieu. En outre, cette analyse a permis d'évaluer la photoactivité cellulaire en fonction du temps (évaluée à partir du traitement théorique des signaux via leur déconvolution dans le temps) et de démontrer que ce paramètre est un proxy pertinent pour sonder/détecter des effets de stress et des changements de régime métabolique des biosenseurs bactériens luminescents. L'influence de la qualité nutritive sur le signal temporel de bioluminescence a par la suite été évalué sur un biosenseur constitutif non spécifique *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* qui, pour rappel, ne répond pas à un composé spécifique mais à un stress général (*e.g.* perturbation de l'activité métabolique), et a été comparée aux résultats obtenus pour le biosenseur spécifique *Escherichia coli zntA-luxCDABE* inductibles au Cd(II). Sans surprise, nous avons observé des différences dans leurs signaux respectifs notamment en ce qui concerne la forme générale, le nombre, le positionnement des discontinuités (troncatures) du signal dans le temps et l'intensité de la réponse cellulaire en raison de leurs fonctionnements respectifs différents. Pour autant, nous avons mis en évidence que leur photoactivité cellulaire respective présente quant à elle des similitudes. En particulier, dans des conditions contrôlées par la *réponse stringente* où les signaux de bioluminescence à deux pics produits par les biosenseurs spécifiques et non spécifiques correspondent à deux augmentations sigmoïdales successives de leur photoactivité cellulaire. De manière similaire, les discontinuités engendrées par les répressions cataboliques ont été observées sur la photoactivité cellulaire des biosenseurs spécifiques et non spécifiques.

Pour répondre au deuxième objectif principal de cette thèse, à savoir comment la réponse du biosenseur reflète les couplages entre bioaccumulation, biodisponibilité et spéciation des métaux, des mesures de la réponse temporelle de bioluminescence des 2 biosenseurs *Escherichia coli zntA-luxCDABE* et *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* ont été effectuées en présence d'une concentration fixe en Cd(II), de concentrations variables en ligands moléculaires ou particuliers et en biosenseurs, lesquelles concentrations influencent la biodisponibilité du métal. Ces expérimentations ont été menées sur plusieurs ligands moléculaires qui diffèrent par la stabilité des complexes qu'ils forment avec le Cd(II) et sur plusieurs ligands particuliers (de même nature) différents en termes de taille et de charge

électrostatique. Plus précisément, des mesures de bioluminescence ont été effectuées à basse salinité (10 mM) pour tous les ligands moléculaires (*i.e.* EDTA, glutathion, acide citrique, histidine et cystéine) et nanoparticulaires testés. L'analyse préliminaire a montré qualitativement que l'ajout de ligands moléculaires ou particuliers conduit à une diminution plus ou moins importante de l'amplitude de la réponse de bioluminescence en lien avec la constante de stabilité du complexe, mais surtout à un possible décalage temporel des pics de bioluminescence. Ces résultats valident qualitativement les prédictions de la récente théorie de **Duval et al, 2023** détaillée en **Annexe**. Celle-ci explique en effet que les décalages temporels observés sont engendrés par un *crossstalk* cinétique entre l'éveil des biosenseurs (activation de la photoactivité cellulaire) et la déplétion des métaux en solution (*i.e.* la concentration de métal en solution (*bulk*) diminue au cours du temps). Cette déplétion (sa cinétique et son amplitude en situation d'équilibre) est fonction (i) de la concentration cellulaire qui détermine l'importance des processus de biosorption et de bioaccumulation des métaux, (ii) de la concentration en ligands, qui conditionne la spéciation du métal en solution, et (iii) de la labilité des complexes métalliques en solution, définie par un ensemble de descripteurs cinétiques et thermodynamiques de spéciation et bioaccumulation que nous identifions.

En conclusion, l'ensemble de ces données a permis d'étendre le cadre conceptuel établi par **Duval & Pagnout, (2019, 2020)** en expliquant l'importance de certains paramètres cruciaux pour l'évaluation de la biodisponibilité spéciation des métaux. Le formalisme théorique établit la relation entre dépendance temporelle des signaux de bioluminescence, photoactivité cellulaire et spéciation/biodisponibilité des métaux en solution et ce en dépassant le cadre restrictif des modèles à l'équilibre thermodynamique (du type BLM). En particulier, ce formalisme permet d'identifier les scénarios où la bioaccumulation des métaux est limitée par le flux d'internationalisation des métaux (applicable dans la BLM) ou par leur flux de diffusion, et les cas où les complexes métalliques en solution sont inertes, dynamiques, non labiles ou entièrement labiles en fonction de leur contribution au flux de bioaccumulation du métal libre.

Comme indiqué précédemment, les travaux effectués dans cette thèse ont permis d'étendre le formalisme de **Duval & Pagnout, (2019, 2020)** qui aborde quantitativement les connexions multifactorielles qui régissent le signal temporel des biosenseurs bactériens bioluminescents, avec la prise en compte de la qualité et biodisponibilité des nutriments et les caractéristiques de spéciation métallique extracellulaire contrôlées par la chémodynamique des espèces métalliques. Ce formalisme pourrait être étendu avec l'analyse de mesures de la réponse temporelle de bioluminescence en milieu plus complexe comme par exemple, en présence (i) de ligands différents ou (ii) d'espèces métalliques différentes, lesquelles peuvent entrer en compétition pour l'occupation des sites d'internalisation et *in fine* réduire le signal de bioluminescence. Une autre perspective à ce travail pourrait également

concerner l'évaluation de la toxicité de contaminants à partir de la réponse temporelle de bioluminescence. Toxicité, qui sera évaluée prochainement dans le cadre du projet BioCEL. Ce projet vise à exploiter la réponse temporelle de bioluminescence des biosenseurs *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* (indicateur de l'activité métabolique de la cellule) pour détecter et identifier (i) les effets de toxicité engendrés par des nanoparticules (NPs) et (ii) des virus indicateurs de pollution fécale. Il s'agira dans un premier temps d'effectuer des mesures de bioluminescence et de la concentration cellulaire au cours du temps en présence de nanodendrimères (NPs). Ces dernières sont utilisées en biomédecine pour vectoriser/administrer des médicaments et connues pour exercer des effets cytotoxiques sur de nombreux microorganismes. La réponse temporelle de bioluminescence sera par la suite analysée par la théorie élaborée dans le **chapitre 4** pour les biosenseurs non-spécifiques. Théorie qui sera étendue à la situation où la concentration cellulaire totale (incluant cellules photoactives et inactives) varie dans le temps suite à la mortalité/inhibition de croissance cellulaire médiée par les NPs. La déconvolution des signaux de bioluminescence sera également effectuée afin d'extraire les profils temporels de photoactivité cellulaire. En parallèle, les stress/dommages (*e.g.* peroxydation lipidique, stress oxydant et intégrité membranaire) causés par les NPs sur les biosenseurs seront évalués par cytométrie en flux (CMF) par le biais de fluorophores spécifiques. Des analyses par imagerie confocale et mesure de temps de vie de fluorescence (FLIM) sur les biosenseurs marqués avec les fluorophores utilisés en CMF permettront d'affiner l'identification des modes d'actions délétères (et l'internalisation) de NPs aux échelles cellulaire et sub-populationnelle. Des mesures par microscopie à force atomique (AFM) couplée à la spectroscopie Raman seront effectuées afin de mettre en évidence les effets induits par les NPs sur les propriétés nanomécaniques et biochimiques des surfaces des biosenseurs. Des mesures temporelles de bioluminescence seront aussi collectées sur des biosenseurs bioluminescents semi-spécifiques, répondant à un stress spécifique (*e.g.* stress oxydant et stress osmotique). Dans un second temps, la réponse temporelle de bioluminescence des biosenseurs *Escherichia coli rrnB P1-luxCDABE* sera mesurée en présence de différents coliphages à différents rapports de concentrations phage/biosenseur. Les données seront ensuite déconvoluées par traitement théorique pour évaluer la photoactivité cellulaire au cours du temps et les paramètres clés qui définissent la pathogénicité et la virulence des virus testés (*e.g.* efficacité d'infection, constante cinétique d'infection). Ces résultats définiront les empreintes temporelles recherchées de chaque type de virus et seront mis en regard de données d'infection des biosenseurs estimée par comptage de plages de lyse (PFU) et tests de viabilité. Les réponses des biosenseurs seront également mesurées en présence de mélanges de phages à différents rapports de concentrations.

## *Résumé*

Les biosenseurs à cellule entière sont des organismes modifiés génétiquement pour détecter certains analytes ou stress causés par des composés toxiques des milieux aquatiques. Par construction, les biosenseurs bactériens répondant à un élément métallique donné sondent ‘directement’ sa biodisponibilité lorsqu’il traverse la membrane, exerce ses effets ou est transformé par la cellule. Cependant, les signaux générés par les biosenseurs bioluminescents spécifiques à un métal (systèmes d’intérêts dans cette thèse) sont difficiles à déchiffrer de par leur dépendance non triviale aux facteurs physicochimiques et biochimiques qui contrôlent la spéciation du métal, sa biodisponibilité et sa ‘conversion’ en lumière. Les limites incluent (i) le recours à des modèles à l’équilibre de spéciation des métaux où la labilité des complexes métalliques n’est pas considérée, (ii) une exploitation souvent empirique du pic de bioluminescence sans une analyse de toute l’évolution temporelle du signal pourtant riche d’informations, et (iii) l’absence d’un cadre théorique pour une vision intégrée des processus biophysicochimiques à l’origine de la réponse, depuis le transfert réactif des métaux vers les biosenseurs, l’internalisation des formes métalliques bioactives, jusqu’à l’émission de photons. Cette thèse avait pour objectif de contribuer à proposer des alternatives à ces différentes limites. Dans une première partie, nous montrons comment la réponse temporelle de biosenseurs sensibles au cadmium (*zntA-luxCDABE Escherichia coli*) est modulée par la biodisponibilité des nutriments en solution (acides aminés, sucres) et par les couplages entre réponse stringente et répression catabolique. Ces couplages génèrent des signaux de bioluminescence qui diffèrent en termes de position, nombre, amplitude et forme des pics observés, ces propriétés étant toutes contrôlées par la qualité nutritive du milieu. Sur la base d’un formalisme précédemment publié, les signaux de bioluminescence sont reconstruits, ce qui permet d’évaluer la photoactivité cellulaire en fonction du temps et de la corrélérer aux changements de métabolisme dus aux carences en acides aminés et/ou sucres. Ces résultats clarifient la nécessité de considérer le métabolisme et la typologie associée de réponse du biosenseur pour estimer la biodisponibilité des métaux en solution. Dans une deuxième partie, nous mettons en évidence les connections quantitatives entre réponses temporelles de biosenseurs spécifiques aux métaux et leurs ‘équivalents’ non-spécifiques qui émettent la lumière de façon constitutive. A l’aide d’une formalisation théorique de la réponse de biosenseurs non-spécifiques, nous démontrons comment les réponses distinctes des deux types de biosenseurs reflètent au cours du temps des changements similaires d’activité métabolique et de photoactivité cellulaire malgré les modes différents d’activation de leurs gènes rapporteurs. Dans une dernière partie, nous présentons les réponses d’*E. coli zntA-luxCDABE* inductible au Cd, mesurées pour une large gamme de concentrations de biosenseurs et de différents chélateurs moléculaires et particuliers. Les données sont interprétées qualitativement par une théorie mécaniste développée pour interconnecter réponse temporelle des biosenseurs, métabolisme cellulaire, et biodisponibilité/spéciation des métaux en dépassant le cadre thermodynamique des modèles classiques de spéciation/bioaccumulation. En accord avec la théorie, nous démontrons la non-linéarité des réponses en condition déplétive des métaux en solution, ainsi que l’existence de décalages temporels

des pics de bioluminescence pour des concentrations croissantes en biosenseurs et chélateurs. Nous expliquons l'origine de ces décalages par l'interférence entre les cinétiques d'éveil de la photoactivité cellulaire et de déplétion du métal en solution, et nous démontrons comment la cinétique de déplétion reflète la biodisponibilité du métal et la labilité des complexes métalliques.

# *Abstract*



Whole-cell biosensors are organisms genetically modified to detect analytes or stresses caused by toxic compounds in aquatic environments. By design, bacterial sensors responding to a given metallic element 'directly' probe its bioavailability as it crosses the membrane, exerts its effects or is transformed by the cell. However, the signals generated by metal-specific bioluminescent biosensors (of interest in this PhD) are difficult to decipher due to their non-trivial dependence on physicochemical and biochemical factors controlling metal speciation, bioavailability and 'conversion' into light. Limits include (i) the use of equilibrium models for metal speciation where lability of metal complexes is not considered, (ii) a most often empirical exploitation of bioluminescence peak without analysis of the entire dependence of the signal on time, however rich of information, and (iii) the absence of an integrated theoretical framework for the various biophysicochemical processes at the origin of the response, from the reactive transfer of metals to the surface of the biosensor, the internalization of the bioactive metal forms, up to the very photons emission stage. The aim of this PhD work was to generate, via experiments and theory, some basic knowledge for a better evaluation of metal bioavailability by biosensing and for a design of alternatives to aforementioned limits. In a first part, we show how the time-response of cadmium-sensitive biosensors (*zntA-luxCDABE E. coli*) is mediated by nutrients bioavailability in solution (amino acids, sugars) and by resulting couplings between stringent response and catabolic repression. These couplings generate bioluminescence signals that differ in terms of position, number, amplitude and shape of the observed peaks, these properties being all controlled by the nutritive quality of the medium. Based on a previously published formalism, bioluminescence signals are reconstructed, enabling cell photoactivity to be assessed as a function of time and correlated with changes in metabolism following deficiencies in amino acids and/or sugars. These results clarify the need to consider metabolism and associated typology of biosensor response when estimating metal bioavailability in solution. In a second part, we highlight the quantitative connections between time-responses of metal-specific biosensors and of their non-specific constitutively light-emitting 'counterparts'. Using a theoretical formalism we develop to model the response of the latter biosensor type, we demonstrate how the distinct signals of the two types of biosensors actually reflect similar changes in metabolic activity and cellular photoactivity over time despite differences in the respective activation modes of their reporter genes. In a final part, we report the responses of Cd-responsive *zntA-luxCDABE E. coli* measured over a large range of biosensor concentration and concentration of various molecular and particulate cadmium chelators. Data are qualitatively interpreted by a mechanistic theory we elaborate to interconnect at a dynamic level the time-response of biosensors, cell metabolism and metal speciation/bioavailability properties beyond the thermodynamic framework of classical models (e.g. BLM, FIAM) and related softwares (e.g. Visual MINTEQ). In line with theory, we demonstrate the non-linearity of bioluminescent response under metal depletive conditions in solution, and the existence of time shifts in bioluminescence maxima with increasing concentration of biosensors and

complexing agents. We explain the origin of these shifts by analyzing the coupling between activation kinetics of cell photoactivity and metal depletion kinetics in solution, and we show explicitly how metal depletion kinetics reflects metal bioavailability properties including lability of metal complexes.