

Thèse de Doctorat



Anna HUA

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : Sciences pour l'ingénieur (SPI)

Discipline : Biologie de l'environnement, des populations et écologie (section 67) Spécialité : Génie des procédés et bioprocédés Unité de recherche : GEPEA UMR CNRS 6144

Soutenue le 02 Juillet 2018

Détection et évaluation de la contamination métallique dans des échantillons environnementaux complexes

| | JORT | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---|
| Président du jury | Christian MUSTIN | |
| Rapporteurs : | Ingrid BAZIN, Maitre assistant - HDR, IMT Mines Alès | |
| | Jean-Louis MARTY, Professeur des universités, Université de Perpignan | |
| Examinateurs : | Josselin BOBET, Ingénieur, Solvay | |
| | Christophe CORDELLA, Ingénieur de recherche - HDR, INRA | |
| | Christian MOUGIN, Directeur de recherche, INRA | |
| | Christian MUSTIN, Directeur de recherche, CNRS | |
| Directeur de Thèse : | Gérald THOUAND, Professeur des universités, Université de Nantes | |
| Co-directeur de Thèse : | Marie-José DURAND, Maitre de conférences - HDR, Université de Nantes | j |
| | Mickaël CREGUT, Docteur, CAPACITES | |

DETECTION ET EVALUATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE DANS DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX COMPLEXES

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr Gérald Thouand et le Dr Marie-José Durand-Thouand, directeur et co-directrice de thèse respectivement, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je vous remercie tous les deux pour le temps que vous m'avez accordé, pour tout ce que vous m'avez appris, tant scientifiquement que personnellement. Vous avez été présents dans les bons comme les mauvais moments et je vous remercie pour ça. Plus personnellement, je tiens à vous remercier Gérald de m'avoir encouragée à finir cette thèse lorsque l'envie n'était plus là. Marie José, je vous remercie pour votre présence au quotidien et pour vos nombreuses petites histoires.

Je tiens ensuite à remercier le Dr Mickael Cregut, mon co-encadrant de thèse. Mickael, ton encadrement a largement dépassé les 10% officiels qui t'ont été assignés. Pour les nombreux « j'ai une petite question » qui finissent par s'éterniser ou par dévier de sujet, pour ta présence, ton écoute, ton aide, je te remercie sincèrement.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de mon jury de thèse : le Dr Ingrid Bazin et le Pr Jean-Louis Marty pour avoir accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse, ainsi que le Dr Josselin Bobet, le Dr Christophe Cordella, le Dr Christian Mougin et le Dr Christian Mustin d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je veux aussi remercier l'ensemble des membres du laboratoire, mes précieux collègues du présent et du passé, qui m'ont supportée (dans les deux sens du terme !), écoutée, rassurée, ri aux larmes avec moi et quelques rares fois, essuyé mes larmes. Pour votre présence au quotidien et pour tout ce que ça implique, je vous remercie. Aux membres du « bureau d'à côté », merci de m'avoir aidée, guidée et rassurée dans mon long périple vers le titre de docteur. Aux membres du bureau des doctorants, merci pour les cancans, les pauses blabla et surtout, pour ce soutien mutuel dans cette aventure que l'on mène ensemble.

Je veux remercier tous mes amis, d'ici et d'ailleurs, pour m'avoir soutenue, encouragée, écoutée et écoutée râler, pour m'avoir sortie et changé les idées et de m'avoir nourrie. Merci pour tous les bons moments passés sur la plage, au restaurant, chez vous et ailleurs, toujours bien accompagnée.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, vous qui m'avez permis de réaliser et de concrétiser ce projet et bien plus encore. Je vous aime profondément. Tout ce que j'aurais voulu dire, le jour de ma soutenance, si l'émotion n'avait pas été si présente :

Je tiens à vous remercier tous, pour votre présence et votre attention durant cette présentation, mais surtout pour votre aide et votre soutien lors de ces années. D'une manière ou d'une autre, vous avez contribué à la réalisation et à la concrétisation de cette thèse et je vous en remercie.

Plus personnellement, je tiens à remercier l'ensemble de mes collègues, qui sont devenus bien plus que ça au fil des années. Je tiens à vous remercier pour votre écoute, vos encouragements, vos conseils et pour le piquant de vos blagues parfois. Emilie, Ali, Sulivan, Mickael, Christopher, pour les bons moments passés à vos côtés, merci à vous.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui m'ont permis de me faire sortir du labo, de me changer les idées et de m'échapper de mon quotidien. Merci à la Team escape (on est les meilleurs !), la Team plage (notre bronzage est parfait !) et toute l'équipe VigiCell (ou le bureau des pleurs). Merci à vous tous pour ces moments de convivialité et de légèreté.

Un mot spécial aussi pour mes amis. Je vous remercie sincèrement pour votre énergie et votre patience, votre force de caractère, pour m'avoir maintes et maintes fois répété les mêmes mots d'encouragement et de confiance. Merci à Ana, à Dany, à Nicolas et à Pierre.

Enfin, juste pour finir, un énorme merci à ma famille pour votre amour indéfectible.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques

- Hua A, Gueuné H, Cregut M, Thouand G, Durand M-J (2015) Development of a bacterial bioassay for atrazine and cyanuric acid detection. Front Microbiol 6:211 . doi: 10.3389/fmicb.2015.00211
- Durand MJ, <u>Hua A</u>, Jouanneau S, Cregut M, Thouand G (2015) Detection of Metal and Organometallic Compounds with Bioluminescent Bacterial Bioassays. Adv Biochem Eng Biotechnol. doi: 10.1007/10_2015_332

Congrès avec comité de lecture

Hua A, Cregut M, Jouanneau S, Cordella C. B.Y., Thouand G and Durand M-J "High throughput microbial array for complex environmental sample assessment" 20th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, May 28-31 2018, Nantes – France

Communications par posters

- Hua A, Cregut M, Jouanneau S, Cordella C. B.Y., Thouand G and Durand M-J "High throughput microbial array for complex environmental sample assessment" EcotoxicoMic - First International Conference on Microbial Ecotoxicology, November 21-24 2017, Lyon – France (Poster)
- <u>Hua A</u>, Gueuné H, Cregut M, Thouand G, Durand M-J. "Atrazine and cyanuric acid detection with bioluminescent bacterial reporters." 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, June 23-28 2014, Uppsala, Sweden (Poster)

TABLE DES MATIÈRES

| PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES |
|----------------------------------------------------------------------|
| Publications scientifiques |
| Congrès avec comité de lecture9 |
| Communications par posters9 |
| LISTE DES FIGURES |
| LISTE DES TABLEAUX |
| LISTE DES ABREVIATIONS |
| CONTEXTE GENERAL |
| Chapitre 1 : Synthese bibliographique |
| 1. Généralités sur les Eléments Traces Métalliques 33 |
| 1.1. Définition |
| 1.2. Présence naturelle et sources anthropiques |
| 1.3. Législation liée aux métaux dans les eaux35 |
| 1.4. Toxicité des métaux |
| 1.4.1. Toxicité inhérente aux métaux36 |
| 1.4.2. Facteurs influençant la toxicité |
| 1.4.2.1. Paramètres physico-chimiques |
| 1.4.2.2. Paramètre biologique : notion de biodisponibilité |
| 1.4.3. Evaluation de la toxicité dans le cas de mélange de molécules |
| 1.5. Outils d'évaluation de la toxicité environnementale |
| 1.5.1. Méthodes physico-chimiques40 |
| 1.5.2. Méthodes biologiques |
| 2. Bioéléments bactériens pour la détection des métaux 42 |
| 2.1. Généralités sur les bioéléments bactériens 42 |
| 2.1.1. Principe de construction |
| 2.1.2. Types de bioéléments bactériens45 |
| 2.1.2.1. Bioéléments constitutifs |

| | 2.1.2.2. | Bioéléments inductibles | . 45 |
|----------|------------|--------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.2 | . Déve | loppement de bioéléments bactériens pour la détection des métaux | . 47 |
| 2 | 2.2.1. | Transporteurs impliqués dans la résistance aux métaux | . 47 |
| 2 | 2.2.2. | Gènes rapporteurs | . 48 |
| | 2.2.2.1. | Gène lacZ | . 49 |
| | 2.2.2.2. | Gène gfp | . 49 |
| | 2.2.2.3. | Gène lucFF | . 49 |
| | 2.2.2.4. | Gènes luxAB et luxCDABE | . 50 |
| 2 | 2.2.3. | Bioéléments bactériens bioluminescents pour la détection des métaux | . 50 |
| 2.3 | . Interp | prétation des réponses des bioéléments bactériens | . 53 |
| 3. C | Développe | ement d'outils transcriptomiques à l'échelle du génome pour l'évaluation | de |
| l'écot | oxicité | | . 54 |
| 3.1 | . La tra | inscriptomique en écotoxicologie | . 54 |
| 3.2 | . Appli | cation de la transcriptomique | . 55 |
| 3 | 3.2.1. I | Détermination du mécanisme de résistance et analyse des voies métaboliques | . 55 |
| | 3.2.1.1. | Réponse au cuivre | . 55 |
| | 3.2.1.2. | Réponse à un mélange de métaux | . 57 |
| 3 | 3.2.2. | Prédiction de classe de molécules : comparaison d'empreintes transcriptomiques | 58 |
| 3.3 | . Outils | s dédiés à l'étude du transcriptome à l'échelle du génome | . 59 |
| 3 | 3.3.1. I | Puces à ADN | . 59 |
| 3 | 3.3.2. | Séquençage d'ARN à haut débit | . 60 |
| 3 | 3.3.3. (| Collection de souches d'E. coli fluorescentes | . 61 |
| 3 | 3.3.4. (| Comparaison des trois outils dédiés à l'étude du transcriptome | . 63 |
| 4. C | Drientatio | n et objectifs de cette étude | . 64 |
| CHAPITRE | 2 : Mater | RIEL ET METHODES | . 67 |
| 1. N | Matériel e | t méthodes de microbiologie générale | . 69 |
| 1.1 | . Souch | nes bactériennes | . 69 |
| 1.2 | . Milie | ux de culture et antibiotiques | . 69 |

| 1.2. | 1. | Milieux de culture | 69 |
|--------|--------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2. | .2. | Antibiotiques | 70 |
| 1.3. | Con | ditions de stockage des souches bactériennes | 71 |
| 1.3. | 1. | Stockage des souches bioluminescentes | 71 |
| 1.3. | .2. | Stockage des souches fluorescentes | 71 |
| 1.4. | Mes | ure de l'absorbance | 71 |
| 1.5. | Test | s de toxicité | 71 |
| 1.6. | Lyop | philisation des souches bactériennes en microplaque | 72 |
| 2. Mé | thode | s générales de biologie moléculaire | 73 |
| 2.1. | Extr | action et quantification de l'ADN plasmidique | 73 |
| 2.2. | Amp | blification par PCR et conception des amorces | 73 |
| 2.3. | Dige | stion de l'ADN | 74 |
| 2.4. | Elec | trophorèse sur gel d'agarose | 74 |
| 2.5. | Puri | fication de l'ADN | 75 |
| 2.6. | Liga | tion | 75 |
| 2.7. | Mise | e en compétence des bactéries et transformation | 76 |
| 2.8. | Crib | lage des clones recombinants | 76 |
| 3. Bio | éléme | ent bactérien | 77 |
| 3.1. | Solu | tions d'Eléments Traces Métalliques | 77 |
| 3.2. | Sou | ches bioluminescentes | 78 |
| 3.2. | 1. | Construction des bioéléments | 78 |
| 3 | .2.1.1 | Construction du bioélément E. coli pUCChrlux | 78 |
| 3 | .2.1.2 | Construction des bioéléments E. coli pBpbrlux et E. coli pBgollux | 79 |
| 3.2. | .2. | Induction des souches bioluminescentes | 84 |
| 3 | .2.2.1 | . En présence de bactéries fraiches | 84 |
| 3 | .2.2.2 | . En présence de bactéries lyophilisées | 84 |
| 3.2. | .3. | Mesure et analyse des résultats de bioluminescence | 84 |
| 3.3. | Sou | ches fluorescentes | 85 |

| | 3.3.1. I | Induction des souches fluorescentes | 85 |
|---------|-------------|------------------------------------------------------------------|---------------|
| | 3.3.2. 1 | Mesure et analyse des résultats de fluorescence et d'absorbance | 86 |
| 4. | Analyses d | les données | 86 |
| 4.: | 1. Analy | se des données de bioluminescence par arbres de décision | 86 |
| 4.2 | 2. Traite | ement statistique des données de fluorescence | 88 |
| 5. | Descriptio | n de l'ensemble des échantillons environnementaux | 89 |
| 5.3 | 1. Descr | iption des échantillons | 89 |
| | 5.1.1. I | Echantillons métalliques contaminés au laboratoire | 89 |
| | 5.1.1.1. | Echantillons en eau distillée (E) | 89 |
| | 5.1.1.2. | Echantillons en eau de rivière (R) | 90 |
| | 5.1.2. I | Echantillons environnementaux | |
| | 5.1.2.1. | Echantillons dits de référence (Ref) | 90 |
| | 5.1.2.2. | Echantillons de terre (T) | 90 |
| | 5.1.2.3. | Echantillons industriels Solvay (Sol) | 91 |
| | 5.1.2.4. | Echantillons de bois (B) | 91 |
| 5.2 | 2. Conce | entrations en métaux de chacun des échantillons | 92 |
| 5.3 | 3. Lixivia | ation des échantillons contenus en matrice solide | 94 |
| CHAPITR | e 3: Eval | UATION DE LA TOXICITE D'ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX A L'AIDE D | E BIOELEMENTS |
| BACTERI | ENS | | 95 |
| 1. | Introductio | on | 97 |
| 1.: | 1. Résist | tance au chrome | 97 |
| 1.2 | 2. Résist | tance au plomb | |
| 1.3 | 3. Résist | tance à l'or | 101 |
| 2. | Résultats e | et discussion | 102 |
| 2.: | 1. Carac | térisation des bioéléments bioluminescents construits | 102 |
| | 2.1.1. 9 | Spécificités du bioélément E. coli pUCchrlux | 102 |
| | 2.1.1.1. | En présence de bactéries fraiches | 102 |
| | 2.1.1.2. | En présence de bactéries lyophilisées | 103 |

| | 2.1.2. | Spécificités du bioélément E. coli pBpbrlux108 |
|-----|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| | 2.1.3. | Spécificités du bioélément E. coli pBgollux 110 |
| | 2.2. Cou | uplage des bioéléments détectant les métaux 112 |
| | 2.2.1. | Détection de l'or par le bioélément E. coli pBcoplux 112 |
| | 2.2.2. | Couplages des réponses entre bioéléments 112 |
| | 2.2.3. | Conclusions sur les bioéléments construits115 |
| | 2.3. Car | actérisation de la contamination métallique contenue dans des échantillons |
| | environne | mentaux |
| | 2.3.1. | Échantillon E-Mélange 117 |
| | 2.3.2. | Échantillons contenus en eau de rivière (R)119 |
| | 2.3.3. | Lixiviat de l'échantillon de Boue (Ref-Boue)120 |
| | 2.3.4. | Lixiviats des échantillons de sédiment (Ref-Sed)122 |
| | 2.3.5. | Échantillons industriels Solvay (Sol)123 |
| | 2.3.6. | Lixiviats des échantillons de Terre (T)124 |
| | 2.3.7. | Lixiviats des échantillons de Bois (B) 126 |
| | 2.3.8. | Résumé des caractéristiques de l'ensemble des échantillons 127 |
| 3. | . Conclus | ion |
| Сна | PITRE 4 : CAR | ACTERISATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE A L'AIDE DE PROFILS TRANSCRIPTOMIQUES 131 |
| 1. | . Introduc | tion133 |
| 2. | . Résultat | s et discussion |
| | 2.1. Etu | de préliminaire : choix des concentrations des métaux 133 |
| | 2.2. Mé | thode de traitement des données transcriptomiques selon Elad and Belkin (2013) 135 |
| | 2.2.1. | Présentation de la méthode selon Elad and Belkin (2013) 135 |
| | 2.2.2. | Application de la méthode selon Elad and Belkin (2013) aux 43 échantillons de |
| | l'étude | 136 |
| | 2.3. Dév | veloppement d'une nouvelle méthode d'analyse sur les échantillons en eau distillée |
| | contaminé | s en métaux (E) |
| | 2.3.1. | Mise en place de la méthode138 |

| 2.3.1.1. Absorbance des souches promoterless selon les plaques | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 2.3.1.2. Fluorescence des souches promoterless selon les plaques | |
| 2.3.1.3. Etablissement de la formule pour le calcul du facteur d'induction | |
| 2.3.2. Validation de la méthodologie d'analyse | |
| 2.3.2.1. Description des données transcriptomiques | |
| 2.3.2.2. Analyse fonctionnelle des gènes régulés | |
| 2.3.1. Visualisation des résultats relatifs aux régulations transcriptomiques | |
| 2.4. Description de l'ensemble des échantillons vis-à-vis de leurs transcriptomiques | régulations 149 |
| 2.5 Etablissement de profils transcriptomiques | 150 |
| 2.5. Etablissement de profils transcriptorinques | |
| 2.5.1. Methodologie pour retablissement des profils transcriptomiques | |
| 2.5.2. Profils de reponse lles à la nature des échantilions | |
| 2.5.3. Prom quantati ne à la présence de metal | |
| 2.5.3.1. Etablissement du profil sur les echantilions connus de laboratoire | |
| 2.5.3.2. Application du profil sur les échantillons environnementaux | 153 |
| 2.5.4. Profil lié à la concentration de métal | 157 |
| 2.5.5. Profil lié à la nature du métal | 159 |
| 2.6. Etablissement de profils sur la base de recoupements fonctionnels | 161 |
| 3. Conclusion | 164 |
| 4. Annexes | |
| CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES | |
| 1. Détection spécifique de molécules d'intérêt par bioéléments bactériens | |
| 2. Caractérisation globale de la réponse bactérienne par étude transcriptomique | |
| 3. Couplage des deux méthodes bactériennes développées | |
| 3.1. Description de la méthodologie développée | |
| 3.2. Caractérisation des échantillons environnementaux | |
| 3.3. Avantages et limites des outils bactériens utilisés | |
| 3.3.1. Bioélément bactérien | |

| 3.3.1.1. | Avantages | 182 |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|------------------|
| 3.3.1.2. | Limites | 182 |
| 3.3.2. Et | ude transcriptomique à l'aide de la collection de souches fluorescen | ites 183 |
| 3.3.2.1. | Avantages | 183 |
| 3.3.2.2. | Limites | 183 |
| 3.4. Conclu | sions sur la méthode développée pour l'évaluation de la présence e | t de la toxicité |
| liée aux métai | хі | |
| BIBLIOGRAPHIE | | 187 |

LISTE DES FIGURES

| Figure 1 : Fréquence des contaminants retrouvés dans les sols | 29 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figure 2 : Représentation de la performance (P) en fonction de la concentration (C) de métal prés | sent |
| | 36 |
| Figure 3 : Représentation des notions de disponibilité et de biodisponibilité | 38 |
| Figure 4 : Diversité des organismes utilisés pour l'évaluation de la toxicité | 42 |
| Figure 5 : Différents niveaux d'étude de la réponse bactérienne | 42 |
| Figure 6 : Principe général de construction d'un bioélément bactérien | 43 |
| Figure 7 : Principe de mutagénèse aléatoire via l'utilisation de transposon | 44 |
| Figure 8 : Principe de mutagénèse ciblée | 44 |
| Figure 9 : Représentation de la réponse des souches bactériennes | 46 |
| Figure 10 : Réaction catalysée par la luciférase eucaryote | 50 |
| Figure 11 : Réaction générale catalysée par la luciférase procaryote (Aliivibrio fischeri) | 50 |
| Figure 12 : Spécificité de détection des différents bioéléments bactériens | 53 |
| Figure 13 : Régulations qui se produisent en réponse au cuivre | 57 |
| Figure 14 : Principe de l'analyse par puce à ADN | 60 |
| Figure 15: Principe de l'analyse par RNA-seq | 61 |
| Figure 16 : Présentation de la collection de souches fluorescentes | 62 |
| Figure 17 : Orientation des travaux de thèse | 65 |
| Figure 18 : Etapes de la construction du plasmide pUClux | 80 |
| Figure 19 : Etapes de la construction du plasmide pUCchrlux | 81 |
| Figure 20 : Etapes de la construction du plasmide pBpbrlux | 82 |
| Figure 21 : Etapes de la construction du plasmide pBgollux | 83 |
| Figure 22 : Cinétique de croissance de la souche <i>E. coli</i> U139 | 86 |
| Figure 23 : Arbres de décision dédiés à la détection des métaux arsenic (A), cuivre (B), mercure (C | 2) et |
| cadmium (D) | 88 |
| Figure 24 : Schéma du procédé de traitement des échantillons Solvay | 91 |
| Figure 25 : Gènes impliqués dans la résistance au chrome chez Cupriavidus metallidurans CH34 | 98 |
| Figure 26 : Gènes et mécanisme de résistance au plomb chez Cupriavidus metallidurans CH34 | 99 |
| Figure 27 : Mécanisme d'efflux du plomb chez <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 | 100 |
| Figure 28 : Gènes impliqués dans la résistance à l'or chez Salmonella typhimurium | 101 |
| Figure 29 : Caractérisation de la bactérie E. coli pUCchrlux en condition fraiche en réponse au chro | ome |
| trivalent | 103 |

| Figure 30 : Influence des conditions physiologiques sur la production de bioluminescence par la |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| bactérie <i>E. coli</i> pUCchrlux |
| Figure 31 : Influence de la biomasse bactérienne sur la production de bioluminescence par la bactérie |
| <i>E. coli</i> pUCchrlux |
| Figure 32 : Influence du cryoprotectant sur la production de bioluminescence par la bactérie E. coli |
| pUCchrlux |
| Figure 33 : Influence de la durée d'incubation sur la détection du plomb par la bactérie E. coli |
| pBpbrlux en condition lyophilisée108 |
| Figure 34 : Caractérisation de la souche <i>E. coli</i> pBpbrlux en conditions lyophilisées |
| Figure 35 : Caractérisation de la bactérie E. coli pBgollux en conditions lyophilisées |
| Figure 36 : Détection de l'or par la bactérie <i>E. coli</i> pBcoplux en conditions lyophilisées 112 |
| Figure 37 : Représentation des spécificités des souches bioluminescentes inductibles 113 |
| Figure 38 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence de l'échantillon |
| E-Mélange |
| Figure 39 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des échantillons |
| contenus en eau de rivière |
| Figure 40 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence du lixiviat de |
| l'échantillon de boue121 |
| Figure 41 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des lixiviats des |
| échantillons de sédiment |
| Figure 42 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des échantillons |
| industriels Solvay |
| Figure 43 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des lixiviats des |
| échantillons de terre 125 |
| Figure 44 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des lixiviats des |
| échantillons de bois |
| Figure 45 : Test de toxicité de l'arsenic sur la souche <i>E. coli</i> U139134 |
| Figure 46 : Détail des conditions d'exposition en présence des métaux préparés dans de l'eau distillée |
| Figure 47 : Absorbance moyenne des souches promoterless selon la plaque de bactéries 139 |
| Figure 48 : Fluorescence moyenne des souches promoterless selon la plaque de bactéries 139 |
| Figure 49 : Diagrammes de Venn représentant le nombre de gènes qui sont régulés de manière |
| identique entre les concentrations C1, C2 et C3144 |
| Figure 50 : Cartes représentant les régulations transcriptomiques en réponse aux différents métaux à |
| la concentration C2 |

| Figure 51: Clustergramme représentant les régulations pour l'ensemble des 43 échantillons |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| environnementaux |
| Figure 52 : Intérêt du couplage des méthodes d'ACP et d'AFD150 |
| Figure 53 : Résultats de l'ACP concernant les groupements selon la nature de l'échantillon 151 |
| Figure 54 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur matrice152 |
| Figure 55 : Représentation de l'ACP selon le profil Présence de métal, indépendamment des profils |
| liés à la nature de l'échantillon154 |
| Figure 56 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur absence ou présence de métal, |
| indépendamment des profils liés à la nature de l'échantillon154 |
| Figure 57 : Représentation de l'ACP selon le profil Présence de métal, en tenant compte des variables |
| liées à la nature de l'échantillon155 |
| Figure 58 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur absence ou présence de métal |
| en tenant compte des transcrits liés à la nature de l'échantillon156 |
| Figure 59 : Profils de réponse transcriptomiques liés à la présence de métaux et aux différentes |
| matrices |
| Figure 60 : Représentation de l'ACP selon le profil Concentration des métaux |
| Figure 61 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur concentration en métal 158 |
| Figure 62 : Représentation de l'ACP selon le profil Nature des métaux |
| Figure 63 : Taux de classification des échantillons en fonction de la nature du métal 160 |
| Figure 64 : Principe général de la méthode appliquée pour l'évaluation de la présence et de la toxicité |
| associée à la présence de métaux |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau 1 : Exemples de sources de pollution naturelles et anthropiques par les métaux |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tableau 2 : Valeurs de concentration limite pour les métaux selon la réglementation relative à l'eau |
| de boisson |
| Tableau 3 : Types d'interactions qui peuvent se produire en présence d'un mélange binaire de |
| composés |
| Tableau 4 : Méthodes de détection des métaux par voie physico-chimique 41 |
| Tableau 5 : Liste référençant des transporteurs impliqués dans l'export des métaux |
| Tableau 6 : Caractéristiques des gènes rapporteurs 48 |
| Tableau 7 : Exemple de bioéléments bactériens bioluminescents développés pour la détection des |
| métaux |
| Tableau 8 : Utilisation de bactéries bioluminescentes dans le cas d'applications environnementales 52 |
| Tableau 9 : Nombre de gènes régulés suite à l'exposition de la bactérie E. coli à un mélange de |
| métaux |
| Tableau 10 : Plan générique d'une plaque de la collection63 |
| Tableau 11 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude 69 |
| Tableau 12 : Conditions de croissance des souches bactériennes 69 |
| Tableau 13 : Etapes de la réaction de PCR |
| Tableau 14 : Mix réactionnel utilisé pour les réactions de PCR 74 |
| Tableau 15 : Caractéristiques des amorces utilisées au cours de l'étude 74 |
| Tableau 16 : Composition du mix pour une réaction de ligation 75 |
| Tableau 17 : Solutions d'ETM mères utilisées au cours de l'étude 77 |
| Tableau 18 : Gammes de détection des métaux d'après l'approche par arbres de décision |
| Tableau 19 : Récapitulatif des caractéristiques des échantillons 89 |
| Tableau 20 : Concentrations de métaux retrouvées dans les échantillons |
| Tableau 21 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons Solvay 91 |
| Tableau 22 : Concentrations de métaux retrouvées au sein des échantillons de bois 92 |
| Tableau 23 : Métaux retrouvés au sein des échantillons liquides ou des lixiviats des échantillons |
| solides |
| Tableau 24 : Métaux et limites de détection des souches bactériennes inductibles |
| Tableau 25 : Quantification des métaux présents au sein de l'échantillon E-Mélange |
| Tableau 26 : Quantification des métaux présents dans les échantillons contenus en eau de rivière 119 |
| Tableau 27 : Quantification des métaux présents dans le lixiviat de l'échantillon de boue 121 |
| Tableau 28 : Quantification des métaux présents dans les lixiviats des échantillons de sédiment 122 |

| Tableau 29 : Quantification des métaux présents au sein des échantillons industriels Solvay 123 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tableau 30 : Quantification des métaux présents dans les lixiviats des échantillons de terre 125 |
| Tableau 31 : Quantification des métaux présents au sein des lixiviats des échantillons de bois 127 |
| Tableau 32 : Caractéristiques de l'ensemble des échantillons environnementaux |
| Tableau 33 : Fluorescence et absorbance intrinsèque des échantillons étudiés |
| Tableau 34 : Nombre de gènes régulés selon la nature et la concentration du métal 142 |
| Tableau 35 : Nombre de gènes recoupés entre différents métaux à la concentration C2 143 |
| Tableau 36 : Récapitulatif des voies métaboliques impactées en présence de cuivre 145 |
| Tableau 37 : Profils transcriptomiques relatifs à la nature des échantillons 151 |
| Tableau 38 : Régulation des transcrits spécifiques des concentrations C1, C2 et C3 159 |
| Tableau 39 : Processus biologiques régulés pour les métaux dans l'Eau, les lixiviats de Terre ou les |
| lixiviats de Bois |
| Tableau 40 : Récapitulatif de l'ensemble des données181 |

LISTE DES ABREVIATIONS

A_{620nm} : Absorbance à 620 nm ACP : Analyse en Composantes Principales AFD : Analyse Factorielle Discriminante Cl₂₅ : Concentration Inhibitrice 25 DCE : Directive Cadre sur l'Eau ETM : Eléments Traces Métalliques FI : Facteur d'Induction kpb : kilo paire de bases MCS : Multi Site de Clonage pb : paire de bases PCR : Polymerase Chain Reaction ppm : parties par million RFU : Relative Fluorescence Unit RLU : Relative Luminescence Unit rpm : rotation par minute TI : Taux d'Inhibition

CONTEXTE GENERAL

De part la complexité et la diversité des environnements, des activités anthropiques et industrielles ainsi que des contextes de transfert et de dégradation des molécules, la caractérisation et le suivi de la pollution environnementale constitue un réel défi.

En plus des dispositions contenues dans le Code de l'environnement, la gestion des sites et des sols pollués repose sur la circulaire datant du 8 février 2007. Ce document, définissant leurs modalités de gestion et de réaménagement, est fondé sur trois axes : (*i*) la prévention de la pollution en amont, (*ii*) la gestion de la pollution présente sur sites et (*iii*) la mise en mémoire de l'épisode de contamination.

Un inventaire des sites dont les sols sont susceptibles de contenir des polluants a été réalisé dès les années 1990 en France. A l'heure actuelle, deux bases de données existent : la base de données BASIAS qui recense les sites industriels et les activités de service susceptibles d'avoir contaminé les sites et la base de données BASOL qui répertorie les sites faisant l'objet d'une étude ou d'une prise en charge. D'après cette dernière, les polluants rencontrés sont très variés et sont d'origine organique, minérale ou métallique. La répartition de ces différents polluants est représentée dans la Figure 1. Il est à noter que la majorité des sites contaminés (52%) l'est par la présence de métaux et de métalloïdes. C'est pourquoi, la gestion de la contamination par les éléments métalliques est primordiale.



Figure 1 : Fréquence des contaminants retrouvés dans les sols BTEX : Benzènes, Toluènes, Ethylbenzènes et Xylènes ; HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Issu de la base de données BASOL, sur la base de 2 500 sites répertoriés, données de 2010.

Contexte général

La gestion de la pollution d'un site s'appuie sur un schéma complexe, lequel cherche à définir les sources de pollution, les voies et mécanismes de transfert ainsi que les voies d'exposition et les cibles. Parmi ces points, définir les sources de la pollution constitue l'étape cruciale et indispensable. Pour se faire, deux types d'outils de caractérisation existent : les mesures directes sur site et les mesures hors site. Les mesures directes sur site incluent des outils portables, tels que des kits de détection colorimétriques ou immuno-enzymatiques, ou encore, des appareils de mesure tels que les analyseurs à infrarouge. Ces méthodes, malgré des limitations rencontrées pour l'identification et la quantification des polluants, présentent l'avantage d'avoir une réponse rapide pour les opérateurs de terrain. Au contraire, les mesures hors site se réalisent au laboratoire, après prélèvement. De durée d'analyse plus longue, elles fournissent néanmoins des informations précises sur la nature et la concentration du polluant présent.

L'objectif de ces travaux de thèse est de mettre au point une méthode pour la détection de la contamination métallique ainsi que les effets toxiques qui y sont associés. Pour ce faire, une approche à l'aide de bactéries recombinantes a été développée au laboratoire. Dans une première partie, une approche par bioéléments bioluminescents a été développée. Permettant de détecter et de quantifier la présence de métaux, ceux-ci constituent une première information pour la caractérisation de la pollution. Dans une seconde partie, une analyse à l'échelle du génome bactérien permet d'observer l'ensemble des régulations qui se produisent. Ceci permet la prise d'empreintes spécifiques en réponse à un contaminant métallique par exemple. Enfin, dans une troisième partie, les deux méthodes développées seront couplées en vue de leurs applications coordonnées, afin de répondre à la problématique de la caractérisation des échantillons environnementaux vis-à-vis d'une contamination métallique. Actuellement réalisées en laboratoire, le but de ces travaux sera aussi porté sur la simplification et l'allègement des expériences à réaliser, en vue de leur utilisation sur site.

Cette thèse a été financée par le biais du programme régional MATIERES (MATériaux et Interfaces pour l'Exploitation des RESsources environnementales). Dans le contexte actuel de réchauffement climatique et d'épuisement des ressources fossiles, ce projet cherche à mettre en œuvre des solutions innovantes afin de remplacer le carbone fossile par du carbone renouvelable. Pour cela, la recherche s'articule autour de deux thématiques majeures, à savoir la création de nouveaux matériaux biosourcés, ainsi que le recyclage et la valorisation des déchets. Mes travaux font ainsi partie intégrante de ce second aspect, via le développement d'une méthode pour la caractérisation écotoxicologique des matériaux en amont, dans le but de définir leur potentiel valorisable.

30

CHAPITRE 1 :

Synthese Bibliographique

1. Généralités sur les Eléments Traces Métalliques

1.1. Définition

Les métaux lourds sont définis comme étant des « éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm³. Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale, auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes ». Il est à noter qu'un métalloïde est un élément qui combine certaines caractéristiques du métal et d'autres caractéristiques opposées, l'absence de conductivité par exemple (Miquel 2001). Cependant, le terme de métaux lourds est souvent discuté, du fait que certains métaux ne soient pas « lourds » (cas du zinc et de l'aluminium) et que, comme précédemment énoncé, certains ne sont pas des métaux (cas de l'arsenic qui est un métalloïde). De ce fait, la notion d'« Eléments Traces Métalliques » (ETM) est préférée à celle de « métaux lourds » par la communauté scientifique. Ce terme sera par la suite utilisé dans l'ensemble du manuscrit.

1.2. Présence naturelle et sources anthropiques

La présence des ETM dans l'environnement a des origines à la fois naturelles et anthropiques (Tableau 1).

Les ETM sont retrouvés naturellement dans les roches et les sédiments océaniques. Ces métaux sont aussi retrouvés dans l'eau et dans l'atmosphère, par les érosions qui transportent les métaux vers les sols et les eaux de surface, ou bien par le biais des éruptions volcaniques (Tchounwou et al. 2012).

Naturellement, les métaux se trouvent sous des formes ioniques qui sont généralement inoffensives pour les organismes vivants. Cependant, les activités anthropiques ont conduit à des modifications de la répartition des métaux, de leurs formes chimiques, ainsi que des concentrations qui sont retrouvées dans l'environnement. En effet, pour des applications industrielles, les métaux ont été extraits, purifiés et transformés par l'homme. Ces composés sont ensuite utilisés et retrouvés dans de nombreux domaines. Que ce soit dans les industries chimiques et extractives, en agriculture via l'utilisation de biocides, ou bien par l'incinération de déchets ou par la combustion d'essence, les activités humaines sont largement responsables de la pollution des environnements par les métaux. De nombreuses études de cas réalisées dans le monde entier montrent l'importance des pollutions imputables à l'activité humaine (Manta et al. 2002; Hernandez et al. 2003; Defew et al. 2005; Christophoridis et al. 2009). En France aussi, l'activité humaine a largement contribué à la contamination des environnements. En 2012, 3 079 (83%) des sites et sols pollués ont pour origine l'activité industrielle. Plus d'un tiers de ces sites se trouvent dans les régions Rhône – Alpes, Nord –

Pas de Calais et Ile de France. Les sources de ces pollutions proviennent des activités de métallurgie à hauteur de 20%, mécanique/électrique à hauteur de 20% également, ainsi que des activités de chimie/pharmacie à hauteur de 15% (Maurice 2014).

| Métal | Sources naturelles | Sources anthropiques | Référence |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Arsenic | Roches : < 1 à 15 mg As.kg ⁻¹ ; Eaux : 1 à 2 μg.L ⁻¹ | Industrie chimique et métallique Agriculture : pesticides Agents de préservation du bois | Bisson et al. (2010a) |
| Cadmium | Elément naturel rare dans l'environnement | Utilisations dans les batteries | Bisson and Houeix (2014) |
| Chrome | Présence terrestre et atmosphérique Roches : 2 à 60 mg kg ⁻¹ : Faux : < 112 ug L ⁻¹ | Utilisations dans l'industrie métallique | Pichard et al. |
| Cuivre | Présence terrestre et atmosphérique Croute terrestre : 4 à 200 mg.kg ⁻¹ ; Eaux : 0,25 µg.L ⁻¹ | Industries métallurgiques Agriculture : fertiliseurs, biocides Agent antisalissure dans les peintures | Pichard et al. (2005b) |
| Mercure | Présence terrestre et atmosphérique | Industrie pétrolière et électrique Utilisation dans les produits dentaires | Bisson et al. (2010b) |
| Plomb | Présent dans la croute terrestre Roches : 5 à 25 mg.kg ⁻¹ ; Eaux : 1 à 60 μg.L ⁻¹ | Industries métallurgiques, automobiles et chimiques | Bisson et al. (2016) |
| Zinc | Présent dans les roches et les sols Sédiments : 40 à 245 mg.kg ⁻¹ | Industrie chimique, cosmétique et métallurgique Agriculture : insecticide, fongicide | Bisson et al. (2005) |

| Tahlaau 1 · Evomples de sources d | le nollution naturelles et | t anthroniques nar les métaux |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Tableau I . Exemples de sources d | e ponution naturenes e | antinopiques par les metaux |

Une fois la contamination établie, celle-ci diffuse rapidement dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Historiquement, les usines ont toujours été implantées au bord de l'eau. Cette implantation s'explique par un transport facilité des matières premières, une utilisation de l'eau au cours des procédés industriels (chauffage/refroidissement, réactions chimiques en milieu aqueux, ...) ou bien pour le rejet des déchets en fin de procédé. Puis, par le biais du cycle de l'eau, les polluants peuvent diffuser du point d'eau vers l'ensemble des masses d'eau, entrainant dès lors des effets sur l'écosystème dans son intégralité : le relargage des molécules toxiques dans les eaux peut conduire à leur bioaccumulation, notamment dans les sédiments (Gromaire·Mertz 2000).

Ainsi, du fait des activités anthropiques, les métaux sont relâchés dans l'environnement sous une forme plus disponible pour les microorganismes qu'initialement, ce qui a pour conséquence l'exposition des organismes vivants à une contamination nouvelle.

1.3. Législation liée aux métaux dans les eaux

Afin de préserver l'environnement, l'Union Européenne a établi un cadre pour une politique globale dans le domaine de l'eau. La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) du 23 octobre 2000 (Directive 2000/60/CE) vise à prévenir et à réduire la pollution de l'eau, à améliorer l'état des écosystèmes aquatiques et à protéger l'environnement pour une utilisation durable de la ressource eau. En application de ce texte, 33 substances définies comme prioritaires doivent être contrôlées en priorité dans l'environnement et respecter les normes de qualité environnementale¹. Cette directive concerne l'ensemble des ressources en eau superficielles (douces et côtières) et souterraines.

En supplément de la DCE, de nouvelles directives ont été adoptées. La Directive 2006/118/CE porte sur la protection des eaux souterraines contre leur pollution et leur détérioration. De même, la Directive 2008/105/CE a pour objet l'établissement de normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau. Enfin, en 2013, la DCE est modifiée et le nombre de substances prioritaires à détecter est porté à 45 (Directive 2013/39/UE). Le Tableau 2 présente une liste non exhaustive de métaux à surveiller dans l'eau de consommation humaine et les valeurs de concentration limite correspondantes.

| Métal | Concentration limite | | |
|---------|----------------------|-------|--|
| Wietai | µg.L⁻¹ | μΜ | |
| Arsenic | 10 | 0,133 | |
| Cadmium | 5 | 0,044 | |
| Chrome | 50 | 0,962 | |
| Cuivre | 2 000 | 31,4 | |
| Mercure | 1 | 0,005 | |
| Nickel | 20 | 0,341 | |
| Plomb | 10 | 0,048 | |

Tableau 2 : Valeurs de concentration limite pour les métaux selon la réglementation relative à l'eau de boisson

Issu de World Health Organization (2008).

¹ Les normes de qualité environnementale définissent la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, dans les sédiments ou dans le biote qui ne doit pas être dépassée afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Définition issue de la Directive 2000/60/CE.

1.4. Toxicité des métaux

1.4.1. Toxicité inhérente aux métaux

L'importance d'un cadre réglementaire vis-à-vis de la concentration des métaux dans les eaux n'est plus à démontrer. En effet, les métaux sont des micropolluants qui peuvent entrainer une toxicité, même s'ils sont présents en quantités très faibles. Outre un effet de volume qui peut augmenter les concentrations de métaux présents dans les eaux, ceux-ci peuvent être bioaccumulés dans les organismes vivants. Il s'agit d'un processus d'assimilation puis d'accumulation de ces molécules qui peut, à terme, causer des effets nocifs sur l'hôte.

Au-delà de leur concentration, la toxicité est aussi liée à la nature des métaux : ceux-ci peuvent présenter un caractère essentiel ou au contraire, non essentiel (Costa et al. 1984; Förstner and Wittmann 2012).

Les métaux essentiels, ou oligo-éléments, sont des métaux nécessaires en faible concentration, qui participent à de nombreuses voies métaboliques et processus cellulaires. Au contraire, lorsque leurs concentrations sont trop élevées, il en résulte des effets toxiques sur l'organisme (Figure 2A). Par exemple, le cuivre est un métal essentiel qui participe à la respiration cellulaire et possède entre autres un rôle antioxydant. Cependant, en excès, le cuivre se lie aux protéines, lipides et acides nucléiques, ce qui le rend hautement toxique (Solioz et al. 2010).

Au contraire, les métaux non essentiels ne sont pas requis pour les organismes vivants, même à faible concentration et présentent des effets toxiques lorsque leurs concentrations augmentent (Figure 2B). En excès, certains métaux entrainent des altérations des composants cellulaires. Par exemple, le mercure possède une forte affinité pour les cystéines et peut interagir avec le site actif de certaines enzymes, ce qui conduit à leur inactivation (LaVoie et al. 2015). D'autres métaux sont des analogues structurels d'ions essentiels et vont empêcher leur liaison sur les sites enzymatiques. C'est notamment le cas de l'arsenic, analogue du phosphate.



Figure 2 : Représentation de la performance (P) en fonction de la concentration (C) de métal présent Le métal impliqué est soit de nature essentiel (A) ou bien non essentiel (B).
1.4.2. Facteurs influençant la toxicité

1.4.2.1. Paramètres physico-chimiques

Deux paramètres physico-chimiques sont à prendre en compte pour l'évaluation de la toxicité des métaux dans l'environnement.

- 1) La composition en matières organiques dans l'environnement influence la rétention des polluants. Par exemple, dans les sols, les substances humiques possèdent une capacité d'échanges ioniques élevée, ce qui conduit à l'adsorption d'importantes quantités de métaux. Ces environnements hautement chargés en métaux peuvent dans un second temps être soumis à lessivage par les eaux de pluie. Ceci peut conduire à une importante contamination des nappes phréatiques, entrainant à son tour une importante toxicité associée à ces polluants (Mortensen 1963; Evans 1989).
- 2) La composition physico-chimique de la matrice (pH, potentiel redox, température) est aussi à prendre en compte puisqu'elle influence directement la spéciation des métaux. Le terme de spéciation est utilisé dans la chimie des sols et des sédiments pour désigner la forme chimique et structurale sous laquelle se trouve un élément métallique (degré d'oxydation, stœchiométrie, coordination et association avec d'autres phases) (Reeder et al. 2006).

La spéciation d'un métal détermine sa solubilité et sa mobilité dans les environnements. Ceci conduit à l'assimilation facilitée des éléments par les organismes à travers les membranes (biodisponibilité), pouvant dès lors entrainer une toxicité. De plus, cette toxicité est liée à la forme chimique de l'élément : alors que la forme Cr(VI) est mobile et potentiellement toxique, la forme Cr(III) est insoluble et peu toxique (Florence et al. 1992). Cependant, l'analyse de la spéciation d'un métal est souvent difficile à réaliser et requiert des méthodes de chimie analytique lourdes, impliquant divers procédés d'extraction (Qasim 2015).

1.4.2.2. Paramètre biologique : notion de biodisponibilité

Du fait des effets toxiques liés aux métaux, l'évaluation de la biodisponibilité est importante. D'après la norme ISO 11074 : 2015 définissant le vocabulaire relatif à la qualité des sols, la biodisponibilité est le « degré auquel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou écologique, ou être disponibles pour une interaction avec les systèmes biologiques ».

La biodisponibilité comprend trois phases distinctes, qui peuvent être associées à trois notions, représentées dans la Figure 3 :

- La disponibilité environnementale caractérise la disponibilité du contaminant dans les sols par des processus physico-chimiques de répartition entre les phases solide et liquide du sol. Il s'agit alors de bioaccessibilité.
- La **biodisponibilité environnementale** est la fraction du composé disponible dans l'environnement qu'un organisme absorbe par des processus physiologiques.
- Enfin, la biodisponibilité toxicologique est la concentration interne accumulée et/ou liée à un effet toxique.

Ainsi, la biodisponibilité réfère à l'interaction et à la capacité des microorganismes à interagir avec les contaminants. Enfin, contrairement à la biodisponibilité, la bioaccessibilité n'est pas définie du point de vue normatif. Dans un environnement d'eau douce, la bioaccessibilité et la biodisponibilité ne sont souvent pas distingués.



Figure 3 : Représentation des notions de disponibilité et de biodisponibilité

1.4.3. Evaluation de la toxicité dans le cas de mélange de molécules

Actuellement, le référencement de l'ECHA (*European CHemical Agency* ou agence européenne des produits chimiques) comprend plus de 139 150 molécules chimiques. L'utilisation de ces nombreuses substances dans les processus industriels peut aboutir à des mélanges de molécules de nature organique et/ou métallique. Les organismes sont donc exposés à des mélanges de molécules pour lesquels il est primordial d'en évaluer la toxicité. Cependant, la toxicité relative due aux mélanges est très difficile à appréhender, du fait qu'elle soit dépendante de plusieurs paramètres. Selon la nature des molécules impliquées, différents types d'interactions peuvent se produire (Tableau 3). De plus,

pour un couple de molécules donné, les effets observés peuvent aussi varier selon les ratios de chacune des molécules, mais aussi selon le temps d'exposition des organismes avec le mélange.

| Type d'interaction | Effets | | Action | Exemple |
|----------------------------------|------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| | | Synergie | L'effet combiné des composants est plus important que l'effet prédit par les modèles d'additivité | 2 + 3 >5 |
| Interaction Supra- additivité | | Potentialisation | L'effet d'un composant est accru par un autre composant qui, seul, n'a pas d'effet | 0 + 3 > 3 |
| | | Coalition | La toxicité des substances en mélange est supérieure à l'additivité, les substances seules sont non toxiques. | 0 + 0 = 4 |
| Pas d'interaction | Additivité | Additivité stricte | La toxicité observée d'un mélange correspond à la toxicité attendue | 2 + 3 = 5 |
| Interaction | Sub- | | L'effet des deux composants est moins important que l'effet prédit par les modèles d'additivité. | 2 + 3 < 5 |
| Interaction | additivité | Inhibition | L'effet d'un composant est réduit par un composé qui, seul, n'a pas d'effet | 0 + 3 < 3 |

| Fableau 3 : Types d'inter | ractions qui peuvent s | se produire en présen | ce d'un mélange binai | ire de composés |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|
|---------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|

Issu de Ribera and Taberly (2011).

Dans le cadre des travaux menés par Fulladosa et al. (2005), les relations d'interaction entre 10 mélanges binaires de métaux aux concentrations équitoxiques² ont été étudiées. Alors que les relations sont définies comme antagonistes pour les couples Co-Cd, Cd-Zn, Cd-Pb et Cu-Pb, elles sont synergiques pour les couples Co-Cu et Zn-Pb. Les relations entre les couples Co-Zn, Co-Pb, Cd-Cu et Zn-Cu sont quant à elles additives. Alors qu'il ne s'agit que de mélanges binaires de métaux, les profils des interactions sont déjà complexes et divers.

Les études menées par Wang et al. (2009) sur des modèles bactériens vont encore plus loin dans cette caractérisation. Elles ont mis en évidence le fait que les relations d'interaction sont dépendantes des ratios des molécules et du temps de contact. Au cours de cette étude, les combinaisons de mélanges binaires entre les trois molécules Cu, Cd et phenanthrenequinone (PHQ) ont été étudiés. Alors que les relations d'interactions au sein du couple Cd-PHQ ne sont pas modifiées selon les ratios des différentes molécules, les relations au sein du couple Cu-PHQ évoluent : avec quatre ratios différents, trois types d'interactions différentes sont visibles. De plus, lorsqu'il s'agit du temps d'exposition, les interactions du couple Cu-PHQ sont constantes mais celles

² Un mélange équitoxique correspond à des solutions pour lesquelles chaque composant du mélange est présent à une concentration qui exerce des effets toxiques similaires si traitées séparément. Par exemple, il s'agit d'une inhibition de bioluminescence de 50% en présence du test Microtox[®].

du couple Cd-PHQ sont modifiées. En effet, elles sont synergiques à 30 minutes d'exposition, mais elles deviennent additives à 45 et à 60 minutes d'exposition. Encore une fois, les relations de mélanges sont dépendantes des molécules impliquées et des conditions d'exposition.

Ainsi, du fait du nombre important de mélanges possibles, des études systématiques pour l'évaluation de leur toxicité ne sont pas réalisables. En effet, de par la complexité des conditions expérimentales à prendre en compte, en plus d'une inconnue vis-à-vis de son comportement dans l'environnement (dans le cas des molécules organiques, dégradation partielle et production de substances filles par exemple), il est impossible d'estimer a priori la toxicité d'un mélange. Dans l'Union Européenne, aux Etats-Unis ou bien dans la plupart des organismes internationaux, le modèle utilisé par défaut est celui des additivités des concentrations. Cependant, il a été montré que dans le cas de mélanges complexes (déchets, effluents, ...), les modèles d'additivité n'estiment correctement la toxicité du mélange que dans environ 50% des cas. Pour les autres cas, il est rapporté essentiellement des cas d'antagonisme, les cas de synergisme étant très limités (Backhaus et al. 2000; Ribera and Taberly 2011).

1.5. Outils d'évaluation de la toxicité environnementale

L'analyse des rejets des ETM dans l'environnement se heurte à une limitation majeure : la seule détection de la présence et la mesure de la concentration d'un contaminant sont insuffisantes. En effet, les conditions environnementales influencent la toxicité *in fine* du métal sur l'organisme. Afin de répondre aux objectifs réglementaires, des méthodes d'analyse des métaux par voies physico-chimiques et biologiques ont été mises en place, évaluant respectivement la disponibilité environnementale et la biodisponibilité.

1.5.1. Méthodes physico-chimiques

Les méthodes physico-chimiques sont très largement répandues, du fait de la fiabilité et de la sensibilité des résultats. Elles sont alors particulièrement adaptées pour la quantification des éléments à l'état de trace dans l'environnement. Par exemple, la limite de détection du mercure par spectroscopie de fluorescence atomique est de 1 ng.L⁻¹. Dans le contexte normatif, des méthodes physico-chimiques dédiées à la détection des métaux ont été publiées (Tableau 4).

| Norme | Métaux dosés | Méthode chimique |
|-------------------|------------------------------------------------|------------------|
| ISO 8288:1986 | Cobalt, Nickel, Cuivre, Zinc, Cadmium et Plomb | AAS |
| ISO 17378-2:2014 | Arsenic et Antimoine | HG-AAS |
| ISO/TS 19620:2018 | Arsenic (III) et Arsenic (V) | HPLC |
| ISO 5961:1994 | Cadmium | AAS |
| ISO 9174:1998 | Chrome | AAS |
| ISO 23913:2006 | Chrome (VI) | FIA |
| ISO 17852:2006 | Mercure | AFS |

Tableau 4 : Méthodes de détection des métaux par voie physico-chimique

AAS : Atomic Absorption Spectroscopy ; AFS : Atomic Fluorescence Spectrometry ; FIA : Flow Injection Analysis ; HG-AAS : Hydride Generation - Atomic Absorption Spectroscopy ; HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

Cependant, les analyses physico-chimiques présentent quelques limitations. Chaque analyse nécessite une étape préliminaire de traitement de l'échantillon spécifique à l'analyte à doser, en plus de l'appareillage adapté. Dans ce cas, une caractérisation exhaustive d'un échantillon inconnu vis-à-vis de sa composition en métaux sera lourde et coûteuse du fait de la multiplication du nombre d'analyses à réaliser (environ 40€ par élément recherché). De plus, les analyses physico-chimiques permettent d'accéder à la fraction disponible dans l'environnement, c'est à dire la concentration mobilisable des métaux. Pour accéder à la fraction biodisponible, des méthodes biologiques sont nécessaires.

1.5.2. Méthodes biologiques

L'utilisation d'une cellule entière permet au polluant de subir l'ensemble des réactions physiologiques. Ceci permet de considérer l'ensemble des étapes de la métabolisation du polluant, depuis son import à sa dégradation, permettant *in fine* d'accéder à la fraction biodisponible des polluants. Par ce biais, il ne s'agit plus de doser la concentration d'un analyte donné, mais d'évaluer les effets et les interactions qui se produisent sur le vivant en réponse aux polluants.

Les méthodes biologiques dédiées à la détection des polluants sont de diverses natures. Dans le contexte normatif relatif aux méthodes biologiques, on recense plus de 70 documents publiés dédiés à l'évaluation de la toxicité. Afin de représenter la diversité biologique, les tests sont réalisés sur différents organismes, de la bactérie jusqu'au poisson. La diversité des espèces utilisées se justifie par leurs différences de sensibilité en fonction des polluants. Ils représentent également différents maillons de la chaine trophique (Figure 4).



Figure 4 : Diversité des organismes utilisés pour l'évaluation de la toxicité

Parmi la multitude d'organismes utilisés, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des bactéries en tant que bioéléments pour l'évaluation de la toxicité. A ce titre, deux niveaux d'observation de la réponse vont être réalisés. Le premier niveau sera porté sur l'étude de la réponse au niveau du promoteur particulier (Figure 5A). Cependant, dans le but d'élargir la réponse observée, le deuxième niveau sera porté sur l'analyse des réponses de l'ensemble des promoteurs de la bactérie. De ce fait, la réponse est située à l'échelle du génome entier, et non plus au niveau du promoteur individuel (Figure 5B). Ces deux niveaux seront respectivement abordés dans les chapitres 3 et 4 de ce manuscrit.



Figure 5 : Différents niveaux d'étude de la réponse bactérienne

2. Bioéléments bactériens pour la détection des métaux

2.1. Généralités sur les bioéléments bactériens

2.1.1. Principe de construction

La construction d'un bioélément bactérien est basée sur la fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène x (Px) avec un gène rapporteur. Dans la bactérie initiale, l'activation du promoteur Px conduit à la transcription du gène x, puis à la traduction de la protéine X. Dans la bactérie rapportrice, le promoteur Px est détourné de sa construction d'origine pour être fusionné de

manière transcriptionnelle avec un gène rapporteur. Ainsi, l'expression du promoteur P*x* conduit à la synthèse de la protéine rapportrice. La simple mesure de l'activité de la protéine rapportrice constitue donc un indicateur du niveau d'expression du promoteur P*x* (Figure 6).



Figure 6 : Principe général de construction d'un bioélément bactérien

Il existe deux méthodes pour construire les souches rapportrices : une méthode aléatoire et une méthode par clonage direct.

1) Par clonage aléatoire, la méthode la plus employée consiste à utiliser un transposon. Un transposon est une séquence d'ADN capable de se déplacer et de s'insérer de manière aléatoire dans le génome. Dans le principe d'une mutagénèse aléatoire, le transposon possède un gène rapporteur sans promoteur en amont. Cette absence permet de générer des fusions transcriptionnelles entre un des promoteurs portés sur le chromosome et le gène rapporteur porté par le transposon. Suite à la réalisation d'une banque de mutants, seuls les clones induisant la protéine rapportrice en présence de la molécule d'intérêt sont sélectionnés. Enfin, le séquençage permet d'identifier le promoteur impliqué dans la réponse (Gueuné et al. 2008) (Figure 7). Des souches détectrices d'arséniate de cuivre chromaté (Cai and DuBow 1997) ou encore de tributylétain (Briscoe et al. 1996; Gueuné et al. 2009) ont entre autres été construites sur ce principe.



Figure 7 : Principe de mutagénèse aléatoire via l'utilisation de transposon Issu de Nature Publishing Group (2007).

2) La méthode de clonage direct est plus simple et plus rapide à réaliser. Dans ce cas, la fusion transcriptionnelle est réalisée entre un promoteur connu du génome et un gène rapporteur. Suite à la construction du plasmide et à sa transformation au sein de la bactérie hôte, les clones produits sont alors criblés et vérifiés pour leurs réponses à la molécule d'intérêt (Figure 8). Cette méthode de construction est celle qui a été utilisée au cours de l'étude.



Figure 8 : Principe de mutagénèse ciblée

2.1.2. Types de bioéléments bactériens

Deux types de bioéléments rapporteurs existent : les bioéléments constitutifs et les bioéléments inductibles.

2.1.2.1. Bioéléments constitutifs

Les bioéléments constitutifs existent sous forme de cellules naturelles ou bien peuvent être construits au laboratoire et sont des organismes génétiquement modifiés. Du fait de leur très grande sensibilité à divers polluants, ces bactéries permettent de mesurer la toxicité d'échantillons. Cependant, ils ne peuvent pas fournir d'informations sur l'identité des contaminants, c'est pourquoi ils sont décrits comme étant non spécifiques.

La bactérie naturelle la plus communément utilisée comme bioélément constitutif est *Aliivibrio fischeri* (anciennement *Vibrio fischeri*). Elle possède un promoteur constitutivement exprimé en amont des gènes de bioluminescence *luxCDABE*. En conditions non toxiques, la bactérie va produire d'importants niveaux de bioluminescence. Cependant, son contact avec un échantillon toxique va affecter sa physiologie, entrainer une toxicité, ce qui se traduit par une diminution de bioluminescence (Figure 9A). Dans le cadre de l'application de la norme ISO 11348 : 2007 relatif à la qualité de l'eau, de nombreux systèmes commerciaux utilisant cette bactérie ont été développés (Microtox[®], BioTox[®], LumiStox[®], ToxAltert[®]). Les prix de ces tests commerciaux varient entre 0,50 et 2,50 € par analyse.

2.1.2.2. Bioéléments inductibles

Le second type de bioéléments développés est représenté par les bioéléments inductibles. Le promoteur n'est plus constitutivement exprimé, mais son expression est au contraire dépendante de l'interaction avec un composé chimique spécifique. La liaison de la molécule sur son facteur de transcription active l'expression du promoteur et du gène rapporteur. Plusieurs phases sont observées : dans un premier temps, les concentrations de l'analyse sont trop faibles pour activer le promoteur, seul un bruit de fond est observé. A partir d'une concentration seuil, le signal augmente de manière linéaire avec les concentrations de l'inducteur, ce qui permet la quantification de l'analyte. Enfin, à partir d'une certaine concentration, les concentrations exercent un effet cytotoxique sur la cellule et le signal de bioluminescence diminue rapidement (Figure 9B).



Figure 9 : Représentation de la réponse des souches bactériennes

(A) Souches constitutives et (B) Souches inductibles. Le gène rapporteur utilisé est celui de la bioluminescence, à savoir *luxCDABE*.

La spécificité du bioélément inductible est dépendante du promoteur utilisé. Deux types de bioéléments inductibles, à savoir semi-spécifique et spécifique, ont été développés.

• Bioéléments inductibles semi-spécifiques

Les bioéléments semi-spécifiques ne permettent pas l'identification du polluant, mais permettent malgré tout de définir la nature des effets qui sont engendrés sur le vivant. Ceux-ci répondent à des changements globaux dans la cellule. Par exemple, les deux tests commerciaux VitoTox[®] et SOS chromotest[®] sont tous les deux utilisés dans le cadre de la détection des lésions à l'ADN. Pour cela, ces tests sont basés sur une fusion transcriptionnelle entre un des gènes impliqués dans la voie de

réparation de l'ADN (voie SOS) avec un gène rapporteur (Quillardet et al. 1982; van der Lelie et al. 1997). De même, il existe des bioéléments bactériens qui ont été développés au laboratoire pour la détection des stress oxydants (Belkin et al. 1996; Mitchell and Gu 2004; Niazi et al. 2008), ou encore pour la détection des perturbateurs endocriniens (Rodriguez-Mozaz et al. 2004). Encore une fois, il s'agit de la fusion transcriptionnelle entre un des gènes impliqués dans ces voies de signalisation à un gène rapporteur.

• Bioéléments inductibles spécifiques

Les bioéléments spécifiques permettent quant à eux l'identification d'un polluant ou d'un groupe de polluants. En conditions naturelles, l'exposition à une molécule toxique active le mécanisme de résistance de la cellule, ce qui lui permet de se défendre. Les bioéléments spécifiques exploitent cette capacité : du fait que le facteur de transcription soit dérivé du système de résistance bactérien ou un gène impliqué dans la dégradation des molécules organiques, l'induction de celui-ci et *a fortiori* la production de la protéine rapportrice sont spécifiques de la molécule à détecter.

Dans le cadre des travaux réalisés au cours de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la détection des métaux.

2.2. Développement de bioéléments bactériens pour la détection des métaux

2.2.1. Transporteurs impliqués dans la résistance aux métaux

Du fait que les métaux soient ubiquitaires dans l'environnement, les bactéries doivent contrôler les apports de ces derniers. Ainsi, les concentrations en métaux dans la cellule sont modulées selon leur rôle essentiel ou non : dans le cas de métaux essentiels, l'import est régulé selon les besoins. Au contraire, l'apport des métaux non essentiels n'est pas régulé et est représentatif des concentrations de métaux présentes dans l'environnement (Figure 2) (Amiard 2011).

Chez les microorganismes, cinq mécanismes de résistance aux métaux existent. Parmi eux, le système de transport actif pour l'expulsion des métaux hors de la cellule est majoritairement représenté. L'expression de ces systèmes est contrôlée par des régulateurs qui lient les métaux avec une grande affinité (Bruins et al. 2000). Une liste de ces transporteurs est représentée dans le Tableau 5. Il est à noter cependant que de nombreux homologues de ces transporteurs existent chez différents genres bactériens et n'ont pas été représentés dans ce tableau. La construction de

bioéléments sensibles aux métaux est alors réalisée via la fusion d'un de ces transporteurs avec un gène rapporteur.

| Métal | Gène impliqué | Souche bactérienne porteuse | Référence |
|-----------|-------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Aluminium | fliC | E. coli | Guzzo et al. (1992) |
| Arsenic | arsA | E. coli | Cervantes et al. (1994) |
| Cadmium | cadA | Staphylococcus aureus | Yoon and Silver (1991) |
| Chrome | Opéron <i>chr</i> | Cupriavidus metallidurans CH34 | Juhnke et al. (2002) |
| Cobalt | соаТ | Synechocystis sp. PCC 6803 | Peca et al. (2008) |
| Cuivre | сорА | E. coli | Rensing et al. (2000) |
| Fer | pupA | Pseudomonas putida | Khang et al. (1997) |
| Manganèse | mntX | Neisseria meningiditis | Veyrier et al. (2011) |
| Mercure | Opéron <i>mer</i> | Transposon Tn21 | Ross et al. (1989) |
| Nickel | rcnR | E. coli | lwig et al. (2006) |
| Or | Opéron gol | Salmonella enterica | Zammit et al. (2013) |
| Plomb | Opéron <i>pbr</i> | Cupriavidus metallidurans CH34 | Hynninen et al. (2009) |
| Zinc | zntA | E. coli | Rensing et al. (1997) |

| Tableau 5 : Liste référencar | t des transporteurs | impliqués dans | l'export des n | nétaux |
|------------------------------|---------------------|----------------|----------------|--------|
| | | | | |

2.2.2. Gènes rapporteurs

Le gène rapporteur a pour rôle de rapporter l'activité transcriptionnelle du promoteur auquel il est fusionné. Il doit donc être facilement détectable, quantifiable et posséder une grande sensibilité. De plus, il doit permettre une estimation en temps réel du niveau de transcription du gène auquel il est fusionné. Enfin, dans le cas d'applications environnementales, le produit du gène doit être absent de l'échantillon à tester.

Différents gènes rapporteurs sont utilisés. Ceux-ci sont décrits dans les paragraphes suivants ainsi que dans le Tableau 6 (Naylor 1999; Schenborn and Groskreutz 1999; Köhler et al. 2000).

| Gène | Avantagos | Inconvénients | | |
|------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--|--|
| rapporteur | Availages | | | |
| lacZ | Gène bien caractérisé, stable, sensible | Activité endogène | | |
| gfp | Autofluorescence de la protéine, pas d'activité endogène | Pas d'amplification du signal | | |
| luc | Pas d'activité endogène | Nécessite du substrat, de l'O2 et de l'ATP | | |
| luxAB, | Bien adaptée pour l'étude de la transcription des gènes | Nécessite de l'O ₂ et du substrat pour <i>luxAB</i> | | |
| luxCDABE | dans les cellules procaryotes et eucaryotes | | | |

Tableau 6 : Caractéristiques des gènes rapporteurs

2.2.2.1. Gène lacZ

Le gène *lacZ* est issu de la bactérie *E. coli*. Ce gène code pour la β-galactosidase, une enzyme tétramérique de 116 kDa, responsable de l'hydrolyse des β-galactosides en lactose. L'hydrolyse du substrat orthonitrophényl-β-galactoside (ONPG) suivie de son oxydation conduit à la formation de l'orthonitrophénol (ONP), qui est un produit jaune. La quantification du produit par spectrophotométrie à 420 nm permet le suivi de la réaction.

Cette enzyme est sensible et produit des signaux intenses. Ce gène peut être utilisé en tant que gène rapporteur au sein d'organismes procaryotes et eucaryotes, mais du fait qu'elle soit présente chez *E. coli*, un témoin négatif représentant l'activité basale est nécessaire.

2.2.2.2. Gène gfp

Le gène *gfp* est issu de la méduse *Aequorea victoria*. Ce gène code pour la *Green Fluorescent Protein* (GFP), une protéine de 27 kDa. Elle est auto-fluorescente, c'est-à-dire que lorsqu'elle est excitée avec à la longueur d'onde de 395 nm, elle émet de la lumière à 508 nm (lumière verte). De plus, des mutants basés sur des modifications d'acides aminés conduisent à des émissions de couleurs à différentes longueurs d'onde correspondant au bleu (450 nm), au jaune (527 nm) ou encore au rouge (588 nm). Les mesures de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un fluorimètre.

Du fait que cette protéine soit auto-fluorescente, elle ne nécessite pas de substrat. De plus, elle est très stable à la chaleur, au pH ou à la dénaturation chimique et peut être exprimée dans les cellules procaryotes comme eucaryotes. Une fois la GFP produite dans les cellules, le signal de fluorescence produit peut s'accumuler au cours du temps.

2.2.2.3. Gène lucFF

La *firefly* luciférase est issue de la luciole *Photinus pyralis*. La réaction se réalise en conditions aérobies et est basée sur le transfert d'énergie entre l'ATP et le substrat luciferine. Il en résulte la formation d'oxyluciferine, d'AMP, de dioxyde de carbone, en plus d'une émission de lumière à 560 nm, qui peut être lue à l'aide d'un luminomètre (Figure 10).

Cette technique est très sensible, mais nécessite néanmoins l'ajout du substrat. De plus, la réaction de la luminescence est dépendante de l'apport en ATP et donc de la physiologie cellulaire.

Luciférase eucaryote (luc) :

Luciférine + O₂ + Mg²⁺ + ATP → Oxyluciférine + AMP + PPi + hɣ (560 nm)

Figure 10 : Réaction catalysée par la luciférase eucaryote

2.2.2.4. Gènes luxAB et luxCDABE

La luciférase bactérienne est issue de différentes souches bactériennes, telles que *Aliivibrio fischeri* ou *Photorhabdus luminescens*. Cette enzyme catalyse en conditions aérobies l'oxydation d'une flavine mononucléotide sous forme réduite (FMNH₂) et un aldéhyde à longue chaine (RCHO) pour produire une flavine mononucléotide et l'acide carboxylique correspondant, avec une production de lumière autour de 490 nm (Figure 11). La luciférase est codée par les deux gènes *luxAB*, et la synthèse de l'aldéhyde est codée par les gènes *luxCDE*. Deux types de constructions sont possibles : la construction avec l'opéron entier *luxCDABE* ou bien la construction avec l'enzyme *luxAB* uniquement. Dans ce deuxième cas, l'aldéhyde doit être ajouté avant la mesure.

Comme la mesure de la GFP, la mesure de luminescence est réalisable de façon non destructive et en temps réel. Cependant, cette réaction nécessite une activité métabolique bactérienne élevée, ainsi que l'abondance en oxygène et en FMNH₂.

Luciférase procaryote (IuxCDABE) : FMNH₂ + O₂ + RCHO \rightarrow FMN + RCOOH + H₂O + hy (490 nm)

Figure 11 : Réaction générale catalysée par la luciférase procaryote (Aliivibrio fischeri)

2.2.3. Bioéléments bactériens bioluminescents pour la détection des métaux

Dans le Tableau 7 sont listés l'ensemble des bioéléments bioluminescents développés à ce jour pour la détection des métaux. Alors que la bactérie *E. coli* est celle qui est majoritairement utilisée en tant que hôte, de nombreux autres genres bactériens sont utilisés. Ce choix se justifie par le contexte d'application du bioélément. Dans le cas de l'évaluation de la présence de métaux dans les sols, la bactérie du sol *Pseudomonas putida* sera préférée à la bactérie intestinale *E. coli*. Cependant, le choix de la souche hôte influe aussi sur la sensibilité de détection du bioélément. A construction identique, la sensibilité de détection sera meilleure pour une bactérie non résistante en comparaison à une bactérie multi-résistante (Magrisso et al. 2008).

Ces bioéléments ont été appliqués sur de nombreuses matrices environnementales, à savoir l'eau, les sols et sédiments et aussi l'air. Alors que les tests évaluant la toxicité générale sont réalisés à

l'aide de souches bactériennes naturellement bioluminescentes, les détections ciblées sont réalisées par le biais de souches recombinantes inductibles. Une liste de ces applications est visible sur le Tableau 8.

| Promoteur | Gène rapporteur | Cible métallique | Référence | | | | | |
|--------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|--|--|--|--|--|
| Souche hôte : Escherichia coli | | | | | | | | |
| arsB | luxAB | As ³⁺ | Cai and DuBow (1997) | | | | | |
| arsR | luxAB | As ³⁺ | Stocker et al. (2003) | | | | | |
| arsR | luxAB | As ³⁺ | Trang et al. (2005) | | | | | |
| Opéron ars | luxCDABE | As ³⁺ , As ⁵⁺ | Flynn et al. (2002) | | | | | |
| arsR | luxCDABE | As ³⁺ | Baumann and van der Meer (2007) | | | | | |
| arsR | luxCDABE | As ³⁺ , As ⁵⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| arsR | luxCDABE | As ³⁺ , As ⁵⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ | Charrier et al. (2011) | | | | | |
| arsR | luxCDABE | As ³⁺ , As ⁵⁺ | Sharma et al. (2013) | | | | | |
| pl258 | luxAB | Cd ²⁺ | Corbisier et al. (1993) | | | | | |
| сорА | luxCDABE | Cu ²⁺ , Ag ⁺ | Riether et al. (2001) | | | | | |
| сорА | gènes <i>lux</i> | Cu ²⁺ | Stoyanov et al. (2003) | | | | | |
| cueR et copA | luxCDABE | Cu ²⁺ , Ag ⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| сорА | luxCDABE | As ³⁺ , As ⁵⁺ | Charrier et al. (2011) | | | | | |
| merR-merT | luxCDABE | Hg ²⁺ | Selifonova et al. (1993) | | | | | |
| merR | luxCDABE | Hg ²⁺ | Ivask et al. (2007) | | | | | |
| merR | luxCDABE | Hg ²⁺ , métylmercure, Cd ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| merR | luxCDABE | Hg ²⁺ | Charrier et al. (2011) | | | | | |
| celF | luxAB | Ni ²⁺ | Guzzo and DuBow (1991) | | | | | |
| zntA | luxCDABE | Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ | Riether et al. (2001) | | | | | |
| zntR et zntA | luxCDABE | Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| zntA | luxCDABE | Zn ²⁺ | Charrier et al. (2011) | | | | | |
| | Souche hôt | e : Pseudomonas fluorescei | 15 | | | | | |
| cadRA | luxCDABE | Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| Tn5 | luxAB | Cu ²⁺ | Brandt et al. (2009) | | | | | |
| cueR et copA | luxCDABE | Cu ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| merR | luxCDABE | Hg ²⁺ , méthylmercure, Cd ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| pbrRA | luxCDABE | Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| zntR et zntA | luxCDABE | Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| | Souche h | ôte : <i>Pseudomonas putida</i> | | | | | | |
| cadA1 | luxCDABE | Zn ²⁺ | Hynninen et al. (2010) | | | | | |
| czcCBA | luxCDABE | Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ | Hynninen et al. (2010) | | | | | |
| pupA | luxCDABE | Fe ³⁺ | Khang et al. (1997) | | | | | |
| | Souche hô | te : Staphylococcus aureus | | | | | | |
| cadCA | luxCDABE | Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |
| | Souch | e hôte : <i>Bacillus subtilis</i> | | | | | | |
| cadCA | luxCDABE | Hg ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ | Ivask et al. (2009) | | | | | |

Tableau 7 : Exemple de bioéléments bactériens bioluminescents développés pour la détection des métaux

| Promoteur | Gène rapporteur | Cible métallique | Référence | | | | |
|------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--|--|--|--|
| Souche hôte : Synechococcus sp. PCC 7002 | | | | | | | |
| isiAB | AB $luxAB$ Fe^{3+} Boyanapalli et al. (2007) | | Boyanapalli et al. (2007) | | | | |
| Souche hôte : Synechococcus sp. PCC 794 | | | | | | | |
| smtA | luxCDABE | Zn ²⁺ | Erbe et al. (1996) | | | | |
| | Souche hôte | e : Synechocystis sp. PCC 68 | 803 | | | | |
| соаТ | luxAB | Co ²⁺ , Zn ²⁺ | Peca et al. (2008) | | | | |
| nrsBACD | luxAB | Ni ²⁺ | Peca et al. (2008) | | | | |
| | Souche hôte : Cupriavidus metallidurans | | | | | | |
| Opéron | luxCDABE | Cu ²⁺ | Leth et al. (2002) | | | | |
| cnrYXH | luxCDABE | Ni ²⁺ , Co ²⁺ | Tibazarwa et al. (2001) | | | | |

Tableau 7 : Exemple de bioéléments bactériens bioluminescents développés pour la détection des métaux (suite)

NT : Non Testé. Adapté de Durand et al. (2015).

Tableau 8 : Utilisation de bactéries bioluminescentes dans le cas d'applications environnementales

| Application | Référence | | | | | | |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| | Systèmes aquatiques | | | | | | |
| Toxicité générale | Philp et al. (2003) ; Magi et al. (2005) | | | | | | |
| Polluants inorganiques | Organométallique (Gueuné et al. 2009) | | | | | | |
| | Métaux (Durand et al. 2003; Trang et al. 2005; Jouanneau et al. 2011) | | | | | | |
| Polluants organiques | Solvants chlorés (Bhattacharyya et al. 2005) | | | | | | |
| | Alcanes (Sticher et al. 1997) | | | | | | |
| | Sols | | | | | | |
| Polluants inorganiques | Métaux (Rasmussen et al. 2000; Ivask et al. 2002) | | | | | | |
| Polluants organiques | Pesticides (Grynkiewicz et al. 2001), | | | | | | |
| | Médicaments (Bolelli et al. 2006) | | | | | | |
| Multianalytes (organique et inorganique) | Palmer et al. (1998) | | | | | | |
| | Sédiments | | | | | | |
| Toxicité générale | Schiewe et al. (1985) ; McCready et al. (2004) | | | | | | |
| Polluants inorganiques | Métaux (Wong et al. 1995) | | | | | | |
| Multianalytes (organique et inorganique) | Park et al. (2005) ; Trott et al. (2007) | | | | | | |
| | Air | | | | | | |
| Polluants organiques | Benzène (Berno et al. 2004) | | | | | | |

Issu de (Rodriguez-Mozaz et al. 2005, 2006; Girotti et al. 2008).

Actuellement, les études sont portées sur le développement de nouveaux bioéléments bactériens. Le problème réside dans le fait que beaucoup de ces études ne s'intéressent pas à la question de la spécificité de détection des bioéléments construits. En effet, sur l'ensemble des 8 bioéléments bactériens destinés à la détection de l'arsenic (Tableau 7), seuls les travaux de Charrier et al. (2011) ont évalué les spécificités du bioélément nouvellement construit. Ainsi, il devient important de

s'intéresser à l'interprétation des données de bioluminescence, notamment par la mise en place de moyens d'analyse pour l'étude de la spécificité de la réponse.

2.3. Interprétation des réponses des bioéléments bactériens

Parmi la multitude des études réalisées sur la construction de bioéléments rapporteurs, seules quelques-unes sont portées sur l'interprétation des données (Ben-Israel et al. 1998; Plegge et al. 2000; Elad et al. 2008).

Deux études vont plus particulièrement être détaillées.

Les travaux réalisés par Lobanov et al. (2001) ont permis une mesure sélective de l'éthanol et du glucose parmi des mélanges binaires de ces deux molécules. Pour cela, deux bioéléments ont été utilisés : un premier bioélément bactérien détectant les deux substrats, ainsi qu'un second bioélément levure qui détecte uniquement l'éthanol. L'analyse des réponses à l'aide de réseaux de neurones ont permis la quantification de ces deux molécules dans une gamme de concentrations comprises entre 1,0 et 8,0 mM et ceci avec des coefficients de détermination élevés (R² = 0,99).

Dans la même idée, l'étude développée par Jouanneau et al. (2011) a pour objectif l'identification et la quantification de quatre métaux à partir de mélanges binaires, ternaires ou quaternaires. Pour cela, quatre bioéléments aux sensibilités différentes ont été utilisés (Figure 12).



Figure 12 : Spécificité de détection des différents bioéléments bactériens

Malgré le fait qu'aucune souche ne soit spécifique à un métal, le couplage des réponses des souches détectrices, en plus de la mise en place d'arbres de décision ont permis l'identification des quatre métaux arsenic, cuivre, mercure et cadmium avec une efficacité globale de 99%. Ce modèle intègre également une approche semi-quantitative des concentrations des métaux présents, avec une

efficacité de prédiction de 95%. Enfin, ce modèle a aussi été appliqué et validé sur des échantillons environnementaux. Outre la construction des bioéléments, l'analyse des données est nécessaire pour l'utilisation de cette technologie pour l'identification et la quantification des contaminants en mélange. En effet, l'utilisation d'un seul bioélément aux détections multiples ne permet pas l'identification de la/des molécule(s) présente(s) dans un échantillon inconnu. Ceci est d'autant plus valable dans le cas de mélanges, où, en plus de la présence de plusieurs molécules, s'ajoutent d'éventuels effets d'interaction. C'est pourquoi l'analyse des données est une étape primordiale et indispensable dans le cas de l'application des bioéléments dans le contexte environnemental.

Actuellement, l'évaluation de la toxicité d'un échantillon repose sur l'utilisation de bioéléments. Cependant, ces tests sont insuffisants pour évaluer le danger associé à différentes classes de molécules chimiques. C'est pourquoi en complément de l'utilisation de ces bioéléments, des outils transcriptomiques destinés à l'évaluation de la toxicité à l'échelle du génome ont été développés. Cet aspect est abordé au cours de la partie suivante.

3. Développement d'outils transcriptomiques à l'échelle du génome pour l'évaluation de l'écotoxicité

3.1. La transcriptomique en écotoxicologie

Actuellement, les tests écotoxicologiques sont réalisés sur des organismes variés appartenant à des systèmes trophiques différents. Cependant, du fait que seuls les paramètres de la létalité, de la croissance, de la reproduction ou de la mutagénicité soient évalués, ces tests sont limités. Partant du principe que les interactions entre les molécules chimiques et les organismes se produisent au niveau moléculaire, il devient nécessaire de s'intéresser à l'impact global sur les organismes. Ceci conduit à l'introduction de la transcriptomique en écotoxicologie et à l'émergence d'une nouvelle discipline, la toxicogénomique (Nuwaysir et al. 1999; Afshari et al. 1999; Neumann and Galvez 2002).

La toxicogénomique a pour but la caractérisation des modifications dans la régulation des gènes suite à l'exposition à une molécule chimique. Ceci est basé sur le principe que les effets toxiques sont accompagnés par un changement dans l'expression de gènes, ce qui se répercute au niveau de la transcription puis de la traduction des gènes. De plus, la toxicogénomique cherche à classer les effets toxiques selon les motifs de régulation de gènes. En effet, un ensemble de composés agissant via un mode d'action similaire induira un profil transcriptomique général propre à ce groupe. Par ailleurs, cet outil est suffisamment précis pour distinguer des dissimilarités et différencier des molécules appartenant à un même groupe. Ainsi, par le suivi de l'expression des gènes, la toxicogénomique peut être utilisée comme un marqueur sensible et informatif de l'état écotoxicologique d'un environnement (Oberemm et al. 2005; Schirmer et al. 2010; Piña and Barata 2011).

3.2. Application de la transcriptomique

3.2.1. Détermination du mécanisme de résistance et analyse des voies métaboliques

Dans le contexte environnemental, la complexité et la diversité des molécules rencontrées rend difficile la prédiction de la nature de la contamination. C'est pourquoi les travaux de recherche sont portés sur la recherche des voies spécifiques affectées par ces molécules. Par la compréhension des effets engendrés sur le vivant, de la voie de signalisation et du mécanisme d'action, il est possible d'adopter une approche de diagnostic.

A l'aide d'une collection de souches rapportrices fluorescentes, les mécanismes de résistance impliqués en réponse aux acides naphtaléniques (Zhang et al. 2011), aux diphényléthers polybromés (Su et al. 2011), ainsi qu'au chlorure de triphénylétain (Su et al. 2013) ont été établis. Dans le contexte environnemental, des études ont aussi été réalisées dans le but de déterminer un ensemble de promoteurs sensibles à la composition et la structure d'un environnement minéral (Parrello 2014). L'élucidation des voies de résistance peut permettre l'identification des fonctions de gènes inconnus. En effet, sous l'hypothèse que des niveaux similaires d'expression peuvent être dus à une fonction proche, il est possible que des gènes co-régulés appartiennent à une seule et même voie métabolique. Ceci permet alors de supposer la fonction de gènes inconnus grâce aux fonctions des gènes connus.

De manière plus ciblée, la réponse aux métaux sur la bactérie *E. coli* a largement été étudiée par le biais des puces à ADN. Parmi les molécules étudiées, on peut citer l'argent (McQuillan and Shaw 2014; Saulou-Bérion et al. 2015), le cadmium (Wang and Crowley 2005), le cobalt (Fantino et al. 2010), le cuivre (Kershaw et al. 2005; Yamamoto and Ishihama 2005), le mercure (LaVoie and Summers 2017), le nickel (Gault et al. 2016; Gault and Rodrigue 2016) ou encore le zinc (Lee et al. 2005; Yamamoto and Ishihama 2005b). Deux cas seront plus particulièrement étudiés : le cuivre et un mélange de six métaux.

3.2.1.1. Réponse au cuivre

L'ensemble des régulations entrainées en réponse au cuivre sur la bactérie *E. coli* ont été décrites dans l'étude menée par Kershaw et al. (2005), grâce aux puces à ADN.

En réponse au cuivre, trois grands phénomènes sont décrits : l'export du cuivre via les pompes à efflux, l'activation des régulons *sox* et *cpx*, ainsi que l'activation du métabolisme du fer. L'ensemble de ces régulations sont visibles sur la Figure 13.

 Tout d'abord, on observe l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie et plus particulièrement ceux impliqués dans l'efflux du cuivre. Parmi les trois systèmes décrits chez *E. coli*, à savoir *cop*, *cue* et *cus*, seul le dernier est représenté au sein de la collection de souches fluorescentes que nous avons utilisée dans cette étude, c'est pourquoi il sera le seul décrit ici.

En réponse au cuivre, on observe l'activation du système de régulation *cus*. Ces gènes sont organisés en régulon, avec d'un côté l'opéron *cusSR* et de l'autre, l'opéron *cusCFBA*. En présence de cuivre, la protéine CusS va s'autophosphoryler, conduisant à la phosphorylation de la protéine CusR. Cette dernière va ensuite se lier à la région promotrice située entre les deux opérons *cusSR* et *cusCFBA*, pour entrainer à son tour la transcription de ces gènes. De plus, il a été montré que cette régulation est concentration dépendante. Il existe en effet une corrélation entre l'augmentation de la concentration de cuivre et la transcription des gènes *cus* (Munson et al. 2000; Yamamoto and Ishihama 2005; Zahid et al. 2012).

- 2) Ensuite, la transformation du Cu(I) en Cu(II) entraine la production de radicaux libres, qui peuvent à leur tour conduire à un mauvais repliement protéique. En réponse à ces deux phénomènes, on observe l'activation du régulon *sox*, répondant à la présence des radicaux libres, ainsi que l'activation du régulon *cpx*, impliqué dans la détection des protéines mal repliées. L'activation du régulon *cpx* conduit à l'augmentation de la synthèse des protéases ainsi qu'à l'augmentation de la synthèse des flagelles.
- Enfin, la présence de cuivre conduit à la diminution de la fraction de fer biodisponible, en plus de limiter son import via la fixation du cuivre sur les récepteurs à fer.



Figure 13 : Régulations qui se produisent en réponse au cuivre

3.2.1.2. Réponse à un mélange de métaux

De même, les réponses transcriptomiques de la bactérie *E. coli* en réponse à un mélange d'ions métalliques ont été étudiées par puce à ADN par l'équipe de Gómez-Sagasti et al. (2014).

Trois conditions d'exposition ont été appliquées : en absence de toxique (0), en présence de la dose MD/4 et en présence de la dose MD, cette dernière correspondant au mélange de 10 μ M d'argent, 10 μ M de cuivre, 10 μ M de cadmium, 300 μ M de zinc, 10 μ M de plomb et 500 μ M de nickel. Les résultats de cette étude sont observables sur le Tableau 9.

| Concentration de métaux | 0 | MD/4 | MD |
|-------------------------------------|-----|------|----|
| Taux d'inhibition de croissance (%) | 0 | 12 | 21 |
| Activation | 299 | 53 | 38 |
| Répression | 532 | 30 | 7 |
| Nombre total de gènes régulés | 831 | 83 | 45 |

 Tableau 9 : Nombre de gènes régulés suite à l'exposition de la bactérie E. coli à un mélange de métaux

MD : dose de métal (Metal Dose, MD). MD contient 10 μ M Ag(I), 10 μ M Pb(II), 10 μ M Cd(II), 10 μ M Cu(II), 500 μ M Ni(II) et 300 μ M Zn(II). Résultats issus de Gómez-Sagasti et al. (2014). MD/4 correspond à la dose MD diluée au ¼ et 0 à l'absence de métaux.

En absence de toxique (0), on observe la régulation de 831 gènes. La condition MD/4 conduit à la régulation de 83 gènes et une inhibition de croissance de 12%. Pour la condition MD, on observe la

régulation de 45 gènes et une inhibition de croissance de 21%. Ainsi, la présence de métal modifie le profil transcriptomique et inhibe légèrement la croissance bactérienne. Concernant les effets du mélange MD/4 au niveau physiologique, trois grandes fonctions métaboliques sont activées. On observe l'activation des gènes impliqués dans l'export du cuivre (*cusB* et *ybaR*), l'activation des gènes de réponse au stress oxydant (*katG*, *ahpF* et *ahpC*) et l'activation des protéines chaperones et des protéases (*isc*, *cys*, *clpB* et *dnaK*). Enfin, parmi les gènes réprimés, aucun groupement fonctionnel de gènes n'est notable. Il est à noter que les régulations en réponse au mélange de métaux sont proches de celles en réponse au cuivre. De ce fait, il semble exister un profil de régulation commun à la présence des métaux.

La deuxième application de la transcriptomique en écotoxicologie concerne la prédiction de classe des polluants, notamment par la mise en place et la comparaison d'empreintes transcriptomiques.

3.2.2. Prédiction de classe de molécules : comparaison d'empreintes transcriptomiques Un autre moyen utilisé pour l'identification des molécules impliquées dans une contamination est la prédiction de classe. Le principe de cette méthode est d'utiliser des connaissances a priori des échantillons pour définir des classes et établir une banque de données comprenant les signatures transcriptomiques de molécules d'intérêt. Ceci présente deux intérêts : (i) la connaissance des signatures moléculaires de groupes de molécules permettront l'établissement de biomarqueurs spécifiques au groupe, ces derniers pouvant être utilisés comme outils de criblage et (ii) la comparaison du profil d'un échantillon inconnu avec cette banque de données permettra de détecter, de classer et d'assigner un échantillon inconnu à un groupe de molécules connues. Ces études peuvent être réalisées sur divers organismes, sous l'unique condition que son génome soit connu et les réponses interprétables du point de vue métabolique.

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental. Trois critères définissent un biomarqueur efficace : (*i*) les temps de mesure doivent être spécifiques à la molécule chimique, (*ii*) la magnitude des changements dans l'expression des gènes doit être relative à la concentration des molécules chimiques et (*iii*) les changements dans l'expression des gènes doit etre suffisamment importants pour être mesurés (Su et al. 2013).

La faisabilité de cette approche a été démontrée par les travaux réalisés par Elad and Belkin (2013), dans le cadre de la détection et de l'identification des polluants présents dans l'eau. Au cours de cette étude, les profils de réponse transcriptomiques de 25 molécules ont été établis. Les molécules étudiées sont des métaux, des génotoxiques, des détergents, des alcools ou encore des hydrocarbures monoaromatiques. Suite à la mise en place de profils de réponse selon la nature de la molécule, le taux de classification correcte d'un échantillon au sein de son groupe d'appartenance est de 87%. Ainsi, par simple comparaisons de profils, ils ont montré qu'il est possible de déterminer la nature d'une contamination. De plus, cette approche permet la mise en place de biomarqueurs représentatifs de chacun des groupes étudiés par le choix de quelques gènes. Ces travaux seront à nouveau abordés au sein du chapitre 4, paragraphe 2.2 et feront l'objet d'une étude plus approfondie.

Dans le contexte de la contamination métallique, une étude visant à distinguer les métaux a été réalisée par l'équipe de Nota et al. (2010). Malgré le fait que certaines régulations soient communes aux métaux, chaque métal possède ses spécificités qui peuvent être mises en évidence par une étude transcriptomique. En l'occurrence, des études réalisées sur le collembole *Folsomia candida* pour l'évaluation de la toxicité des métaux dans les sols a mis en évidence un set de 188 transcrits représentatifs des métaux. Sur la base de ces transcrits, il est possible de classer et de définir la nature du métal parmi six métaux (Chrome, Plomb, Zinc, Cobalt, Cadmium et Baryum) à deux concentrations différentes (Cl₁₀ et Cl₅₀) avec un taux de bonne classification de 83%.

3.3. Outils dédiés à l'étude du transcriptome à l'échelle du génome

Il existe différents outils pour l'étude du transcriptome, à l'échelle du génome. Trois méthodes vont être développées : la méthode des puces à ADN, la méthode du séquençage de l'ARN et la méthode des bactéries rapportrices via l'utilisation d'une collection de souches recombinantes.

3.3.1. Puces à ADN

La technologie des puces à ADN a été développée suite au séquençage des premiers génomes afin d'étudier simultanément l'expression de tous les gènes d'un organisme. Le principe des puces à ADN est basé sur la capacité de reconnaissance spécifique entre des sondes et leurs cibles (Schena et al. 1995). Une puce à ADN possède des sondes (fragments d'ADN) représentatifs des gènes à étudier. Les acides nucléiques à analyser sont extraits des échantillons, puis couplés à un marqueur fluorescent. Les cibles sont mises en contact avec la puce à ADN lors de l'étape d'hybridation et les duplexes sondes/cibles sont détectés à l'aide d'un scanner qui révèle la présence de fluorescence. L'analyse des niveaux de signaux produits permet d'identifier et de quantifier le niveau d'expression de chacun des gènes (Figure 14).



Figure 14 : Principe de l'analyse par puce à ADN Adapté de Pereira et al. (2012).

L'utilisation de cette technologie comprend une limitation majeure : la préparation des échantillons est une étape délicate, du fait que les ARN messagers soient des éléments biologiques facilement dégradables (Zhou and Thompson 2002; Bumgarner 2013; Bier and Kleinjung 2014). De plus, l'étape d'extraction conduit à la génération de stress, qui peut se traduire par la synthèse de protéines de choc thermique par exemple (Watson et al. 1998). Ainsi, cette étape peut être la source de variabilités biologiques non pertinentes.

Les applications environnementales des puces à ADN sont majoritairement destinées au diagnostic, c'est-à-dire pour la caractérisation de la communauté microbienne (Zhou 2003). Des puces à ADN ont été utilisées pour la caractérisation des processus géochimiques, notamment par le suivi des fonctions physiologiques liées au cycle du carbone, de l'azote ou des processus de nitrification par exemple (He et al. 2007). Elles peuvent aussi être utilisées pour la caractérisation des communautés microbiennes, notamment par l'identification des genres et espèces bactériennes composant un environnement (Murray et al. 2001; Wu et al. 2004). Outre les applications environnementales, de nouvelles applications en toxicologie et en écotoxicologie sont en cours de développement. Destinées à évaluer les impacts toxicologiques sur les microorganismes suite à l'exposition à des molécules diverses, elles ne représentent cependant qu'une fraction minoritaire des applications des puces à ADN (Lettieri 2006).

3.3.2. Séquençage d'ARN à haut débit

Le développement du séquençage à ARN fait suite au développement de méthodes de séquençage à haut débit. Le principe de cette technique est basé sur l'extraction puis la fragmentation des ARNm. Suite à une étape de transcription inverse puis à l'ajout d'adaptateurs de séquençage, les ADNc sont séquencés. Une analyse par alignement de séquences entre les *reads* avec une banque de données



génomiques permet de définir le niveau d'expression des gènes (Figure 15) (Wang et al. 2009b; Oshlack et al. 2010).

Cependant, cette méthode présente une limitation majeure. Le nombre total de *reads* est directement lié au niveau d'expression, multiplié par la taille du transcrit. Par conséquent, plus longue est la séquence, plus les lectures seront nombreuses en comparaison des transcrits plus petits avec une expression similaire. Par conséquent, il est possible de surestimer ou sous-estimer l'expression des gènes (Oshlack and Wakefield 2009; Roberts et al. 2011). Dans l'optique de l'étude comparée de deux conditions et niveaux d'exposition, cette méthode n'est alors pas applicable.

3.3.3. Collection de souches d'E. coli fluorescentes

Un autre moyen d'accéder à l'expression des transcrits passe par l'étude de l'activité promotrice. Pour se faire, la collection de souches fluorescentes construite par Zaslaver et al. (2006) a été utilisée. Elle est commercialement disponible auprès de la société Dharmacon (Dharmacon, PEC3877).

Cette collection de promoteurs d'*E. coli* est une banque de souches rapportrices composée de 1 810 souches uniques, contenant chacune un plasmide à faible nombre de copies. Ce dernier porte une fusion transcriptionnelle entre un promoteur décrit de la bactérie, fusionné au gène de fluorescence

Figure 15: Principe de l'analyse par RNA-seq Issu de Wang et al. (2009b). En bleu sont représentés les adaptateurs pour le séquençage.

gfp. Ainsi, par simple lecture de la fluorescence, il est possible d'accéder à l'activité du promoteur (Figure 16A). Dans le cas de l'évaluation des effets induits en réponse à une molécule, l'activité transcriptionnelle est évaluée par la comparaison des niveaux de fluorescence entre la condition d'essai et une condition témoin : dans le cas d'une augmentation de signal, on observe une activation du promoteur. Au contraire, une diminution de signal est signe d'une répression du promoteur (Figure 16B).



Figure 16 : Présentation de la collection de souches fluorescentes

(A) Principe de la construction. (B) Principe de l'analyse transcriptomique avec la collection de souches fluorescentes

Concrètement, ces souches se présentent sous forme d'une série de 21 microplaques de 96 puits chacune. En plus des 1 810 souches uniques, cette collection possède 6 souches référentes présentes sur chacune des plaques. Trois souches de contrôle (*serA*, *wrbA* et *lacZ*), 2 souches dites « *promoterless* », c'est-à-dire sans promoteur en amont du gène *gfp* (souches U66 et U139), ainsi qu'un puits vide sans bactéries (« *Empty* ») sont présentes. Ceci permet à la fois une normalisation des niveaux d'expression ainsi qu'un contrôle inter-plaques. La répartition de ces puits est visible dans le Tableau 10.

Du fait que cette collection ait été jusqu'à présent très peu utilisée, la littérature concernant les éventuelles limitations quant à l'utilisation de celle-ci est inexistante. Cette partie sera donc discutée dans le Chapitre 4 de ce manuscrit.

Tableau 10 : Plan générique d'une plaque de la collection

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------|---|------|---|---|---|---|---|---|------|----|-------|
| Α | | | | | | | | | | | | Empty |
| В | | | | | | | | | | | | |
| С | | | serA | | | | | | | U139 | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| Ε | | | | | | | | | | | | |
| F | | | U66 | | | | | | | wrbA | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| Н | lacZ | | | | | | | | | | | |

Les trois souches de contrôle sont représentées en rouge, les deux souches promoterless en vert et le puits sans bactéries, en turquoise.

3.3.4. Comparaison des trois outils dédiés à l'étude du transcriptome

En comparaison aux puces à ADN et au séquençage d'ARN, l'utilisation de la collection de souches fluorescentes présente trois avantages.

- Tout d'abord, cette méthode est non destructive. Ceci signifie qu'il n'est pas nécessaire d'extraire les acides nucléiques des échantillons, ce qui permet de s'affranchir de l'étape délicate de l'extraction, réduisant de ce fait les variabilités techniques associées.
- 2) Dans un second temps, la durée de contact avec les polluants influence la réponse des organismes, c'est pourquoi il devient important de l'étudier (Hamadeh et al. 2002). Par puce à ADN ou par séquençage d'ARN, cette étude aurait nécessité autant de conditions expérimentales que de points de mesure. Au contraire, dans le cas des souches fluorescentes, du fait que cette méthode ne soit pas destructive, il est possible de réaliser le suivi au cours du temps de l'expression des promoteurs à partir d'une seule condition expérimentale.
- Enfin, cette analyse ne nécessite que peu d'étapes ce qui la rend facile à réaliser. De plus, son coût de revient est faible et limité à l'achat de la collection réutilisable (1 901 €) et à l'appareil de mesure de fluorescence, le fluorimètre.

A l'inverse, une seule limitation est observée quant à l'utilisation de la collection de souches fluorescentes en comparaison aux puces à ADN et au séquençage d'ARN. Alors que ces méthodes s'intéressent aux gènes, la collection de souches fluorescentes ciblent les promoteurs de ces gènes. L'information qui en résulte est alors moins riche, notamment dans le cas des opérons où l'activité de chacun des gènes le composant ne peut pas être étudiée individuellement.

L'utilisation de la collection de souches fluorescentes pour l'évaluation de la réponse du génome de la bactérie *E. coli* en réponse aux stimuli environnementaux reste malgré tout informative puisqu'elle représente plus de 75% des promoteurs connus. De plus, elle présente les avantages d'être simple à appliquer et d'être peu coûteuse. C'est pourquoi, dans la suite des études, le choix de l'outil transcriptomique s'est porté sur la collection de souches fluorescentes.

4. Orientation et objectifs de cette étude

L'évaluation des risques écologiques est un processus complexe du fait des nombreuses variables dont il faut tenir compte. Ceci est d'autant plus vrai dans le contexte environnemental, aux vues de la diversité des écosystèmes. Ainsi, pour détecter et évaluer la toxicité des métaux dans divers environnements, il convient d'utiliser des informations de différentes sources et de coupler leurs réponses afin d'avoir une caractérisation complète d'un environnement inconnu.

Simples d'utilisation, les bioéléments bactériens sont classiquement utilisés dans le contexte environnemental. Cependant, du fait de leur manque de spécificité, seul le couplage des bioéléments bactériens associés à une analyse par arbre de décision permet la semi-quantification des quatre métaux arsenic, cuivre, mercure et cadmium. Cette méthode a été validée notamment dans le cas d'échantillons environnementaux aqueux (Jouanneau et al. 2011). Cependant, cette technique rencontre vite des limites, notamment par la nécessité de développer des souches détectrices ainsi que les arbres de décision correspondants. C'est pourquoi l'étude du transcriptome au niveau génomique est intéressante, du fait qu'elle puisse apporter une vue globale de l'ensemble des régulations se produisant dans la cellule. En effet, cette méthode peut être utilisée pour générer des signatures transcriptionnelles de différents échantillons environnementaux. Actuellement, les travaux réalisés par Elad and Belkin (2013) ont montré la faisabilité de cette technique, notamment par l'établissement de profils de réponse transcriptomique relatifs à une famille de molécules parmi les métaux, les détergents, les alcools, les génotoxiques et les hydrocarbures monoaromatiques.

Ainsi, par une approche multiparamétrique, laquelle prend en compte *(i)* la caractérisation physicochimique (concentrations mobilisables en métaux), *(ii)* la détermination de la toxicité générale et *(iii)* la détermination de la toxicité spécifique par des méthodes bactériennes, il est possible de caractériser et d'évaluer la contamination par les métaux de l'environnement. Dans ce contexte, les travaux répondront à deux problématiques principales. Le premier point cherche à améliorer la spécificité et la sensibilité de détection des souches bioluminescentes via la construction de souches supplémentaires. Le deuxième point concerne l'analyse transcriptomique et questionne notamment vis-à-vis de ses apports : au-delà de l'identification de la famille de molécules selon un profil qualitatif, est-ce que les méthodes d'analyses sont suffisamment sensibles pour générer des profils de réponse différents selon le niveau de contamination ? Selon la nature de la molécule impliquée ? Plus globalement, la problématique à laquelle ces travaux de thèse vont chercher à répondre est de savoir si, par le couplage de l'ensemble de ces méthodes, il est possible de définir la nature et de caractériser la toxicité associée à des polluants présents dans un échantillon environnemental, même présents en mélanges. L'ensemble de ces interrogations et la démarche adoptée sont représentées dans la Figure 17.



2) Etude sur des environnements complexes Liquides/Solides (sédiment, terre, bois)

Figure 17 : Orientation des travaux de thèse

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel et méthodes de microbiologie générale

1.1. Souches bactériennes

Les souches qui ont été utilisées au cours de ces travaux sont répertoriées dans le Tableau 11.

| Nom | Souche hôte | Plasmide | Résistance | Référence | | | | |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------|--|--|--|--|
| | S | Souches de référenc | e | | | | | |
| <i>E. coli</i> K12 MG1655 | - | - | - | ATCC 700926 | | | | |
| E. coli TOP10 | - | - | - | Invitrogen | | | | |
| Cupriavidus | | pMOL28 et | | ATCC 42122 | | | | |
| metallidurans CH34 | - | pMOL30 | - | ATCC 43125 | | | | |
| | Souches bioluminescentes | | | | | | | |
| E. coli pBtaclux | <i>E. coli</i> DH1 | pBtaclux | amp ^R | Charrier et al. (2011) | | | | |
| <i>E. coli</i> pBarslux | | pBarslux | amp ^R | Charrier et al. (2011) | | | | |
| <i>E. coli</i> pBcoplux | | pBcoplux | amp ^R | Charrier et al. (2011) | | | | |
| <i>E. coli</i> pBmerlux | E. coli | pBmerlux | amp ^R | Jouanneau et al. (2011) | | | | |
| <i>E. coli</i> pBzntlux | K12 MG1655 | pBzntlux | amp ^R | Charrier et al. (2011) | | | | |
| <i>E. coli</i> pUCchrlux | | pUCchrlux | amp ^R | Cette étude | | | | |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | pBgollux | amp ^R | Cette étude | | | | |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | E. coli TOP10 | pBpbrlux | amp ^R | Cette étude | | | | |
| | S | ouches fluorescente | es | | | | | |
| 1 930 souches | <i>E. coli</i> K12 MG1655 | 1 930 plasmides différents | kan ^R | Zaslaver et al. (2006) | | | | |

Tableau 11 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude

1.2. Milieux de culture et antibiotiques

1.2.1. Milieux de culture

Les conditions de croissance des souches bactériennes sont récapitulées dans le Tableau 12.

| Souche bactérienne | Milieu de culture | Antibiotique <i>,</i> [C] (µg.mL⁻¹) | Température et agitation |
|---------------------------------|-------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| Souche sauvage, de référence | LB | - | 37°C, 250 rpm |
| Souche bioluminescente | Acétate | Ampicilline, 100 | 30°C, 250 rpm |
| Souche fluorescente | HEPES | Kanamycine, 25 | 37°C, sans agitation |

Tableau 12 : Conditions de croissance des souches bactériennes

La croissance des souches bactériennes de référence se fait dans un milieu riche, à savoir du milieu LB. Il se compose de 5 g.L⁻¹ de chlorure de sodium (Labogros, 9020401) ; 5 g.L⁻¹ d'extraits de levure (Biokar Diagnostics, A1202HA) et 10 g.L⁻¹ de tryptone (Biokar Diagnostics, A1401HA). Le pH final du milieu est de 6,8.

La culture des souches bactériennes bioluminescentes se fait dans du milieu Acétate (Jouanneau et al. 2011). Sa composition est la suivante : 2,835 g.L⁻¹ d'acétate de sodium trihydrate (Sigma, 32318) ; 0,192 g.L⁻¹ de chlorure d'ammonium (Sigma, 09718) ; 0,028 g.L⁻¹ de di-potassium hydrogénophosphate (Sigma, A5764) ; 5 g.L⁻¹ de chlorure de sodium (Labogros, 9020401) ; 0,5 g.L⁻¹ d'extraits de levure (Biokar Diagnostics, A1202HA) ainsi que 1 g.L⁻¹ de tryptone (Biokar Diagnostics, A1401HA). Le pH final du milieu est de 6,8.

La culture des bactéries fluorescentes se fait dans du milieu tamponné avec l'HEPES (Elad and Belkin 2013), dont la composition est la suivante : 10 g.L⁻¹ de tryptone (Biokar Diagnostics, A1401HA) ; 5 g.L⁻¹ de NaCl (Labogros, 9020401) ; 2 g.L⁻¹ de glucose (Sigma, 16301) ainsi que 11,9 g.L⁻¹ d'HEPES (Sigma, H3375). Le pH final du milieu est de 6,8.

L'obtention de milieux gélosés se réalise par l'ajout de 15 g.L⁻¹ d'agar bactériologique (Biokar Diagnostics, A1012HA). Pour chacun des milieux, les différents composants sont dissous dans de l'eau distillée ultra pure et homogénéisés avant autoclavage (120°C, 20 minutes). Les antibiotiques sont ajoutés extemporanément au milieu de culture pour le maintien des plasmides au sein des souches rapportrices.

1.2.2. Antibiotiques

La solution mère d'ampicilline (1000 X) est réalisée à la concentration de 100 mg.mL⁻¹. Pour cela, 1 g d'ampicilline (Sigma, A9518) est dissous dans 10 mL d'eau ultra pure. La solution mère de kanamycine (1000X) est préparée à la concentration de 25 mg.mL⁻¹, par dissolution de 0,025 g de kanamycine (Sigma, 60615) dans 10 mL d'eau ultra pure. Pour les deux antibiotiques, une stérilisation par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm (Dominique Dutscher, 146560) est réalisée. Des aliquots sont réalisés et conservés à -20°C jusqu'à 3 mois après leur préparation.

1.3. Conditions de stockage des souches bactériennes

1.3.1. Stockage des souches bioluminescentes

La conservation des souches bactériennes sur de longues durées est assurée par un stockage à -80°C en présence de glycérol. Pour cela, 1 mL de culture bactérienne après 16 heures de croissance est additionné à 1 mL de glycérol à 25% (V/V). Après homogénéisation, ce mélange est placé dans des cryotubes (Dominique Dutscher, 390460A) qui peuvent ensuite être conservés à –80°C. Ce mode de stockage permet la conservation des souches pendant plusieurs mois.

1.3.2. Stockage des souches fluorescentes

Pour le stockage de longue durée, les bactéries sont cultivées dans 100 μ L de milieu de culture. Après 16 heures de croissance, 100 μ L de glycérol à 50% (V/V) sont ajoutés dans chacun des puits. Les plaques sont ensuite refermées hermétiquement par des films aluminium (Dominique Dutscher, 106570), pour être conservées à – 80°C pendant plusieurs mois.

1.4. Mesure de l'absorbance

La croissance bactérienne peut être évaluée par mesure de la turbidité, à l'aide du spectrophotomètre U-1800 (Hitachi), à la longueur d'onde de 620 nm. Pour cela, 1 mL de la suspension bactérienne est placée dans une cuve transparente (Dominique Dutscher, 090284A) de trajet optique 1 cm.

1.5. Tests de toxicité

Les tests de toxicité sont effectués dans le but de caractériser la réponse d'un toxique vis-à-vis d'un paramètre physiologique. Au cours de ces travaux, ces tests ont été réalisés via l'étude de l'inhibition de la croissance bactérienne en présence de concentrations croissantes de toxique. Ils ont été réalisés sur les souches fluorescentes (souches promoterless U66 et U139 uniquement) dans les conditions de croissance et d'induction de celles-ci.

Suite à une pré-culture de 16 heures, la suspension bactérienne est diluée afin d'obtenir une absorbance à la longueur d'onde de 620 nm (A_{620nm}) de 0,05. Un aliquot de cette suspension (100 µL) est ensuite dispersé dans chacun des puits dans une microplaque transparente (Greiner Cellstar, 655180), auxquels s'ajoutent 25 µL de solution de toxique. La croissance bactérienne est suivie pendant 20 heures, sous une agitation de 200 rpm. La cinétique de croissance est réalisée dans le lecteur Spectrostar Nano (BMG Labtech), programmé pour réaliser une mesure toutes les 5 minutes.

71

Suite au calcul de la vitesse de croissance en phase exponentielle, ces valeurs sont ensuite analysées via la macro Regtox, utilisée pour établir une modélisation des courbes dose-réponse selon le modèle de Hill. Celle-ci est téléchargeable sur le site http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html.

Les dilutions pour les métaux ont toutes été réalisées à l'aide du robot Andrew (Andrew Alliance, Suisse), à l'aide du programme Andrew Lab version 1.4.1.

1.6. Lyophilisation des souches bactériennes en microplaque

La lyophilisation ne concerne que les souches bioluminescentes. Pour cela, une première étape de culture est réalisée à partir de souches conservées en cryotube. Après 16 heures de culture, 20 mL de milieu sont ensemencés avec la pré-culture de sorte à obtenir une absorbance finale (A_{620nm}) proche de 0,1.

La croissance bactérienne est arrêtée dès que la souche bactérienne atteint la valeur $A_{620nm} = 0,45$. Dix millilitres de suspension bactérienne sont prélevés et centrifugés à 6 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot bactérien est ensuite dilué dans du milieu acétate : saccharose 24% (50 : 50) préalablement refroidi à 4°C, de sorte à obtenir une absorbance A_{620nm} de 0,075. Cette suspension bactérienne est ensuite disposée dans une microplaque blanche de 96 puits (Thermo Scientific Nunc, 136101), à hauteur de 100 µL par puits. Enfin, les plaques sont mises à congeler à – 80°C pendant trois heures avant d'être lyophilisées. La lyophilisation est réalisée durant 36 heures, à la température de -56°C et à la pression de 0,05 mbar (Christ alpha 1-2). A l'issue du processus, les plaques sont fermées hermétiquement par un film aluminium (Dominique Dutscher, 106570) et peuvent être conservées à -20°C pendant plusieurs mois.

La solution de saccharose (Sigma, S9378) utilisée au cours de la lyophilisation est réalisée à la concentration de 24% (M/V) dans de l'eau ultra pure et est stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,22 µm. Son ajout dans le milieu de lyophilisation permet d'assurer l'intégrité bactérienne.
2. Méthodes générales de biologie moléculaire

Dans le but d'obtenir de nouvelles souches bactériennes bioluminescentes, des expériences de biologie moléculaire ont été réalisées.

2.1. Extraction et quantification de l'ADN plasmidique

Les plasmides ont été extraits à partir d'une culture bactérienne âgée de 16 heures, permettant ainsi leur extraction en concentration importante. L'extraction plasmidique est faite par midiprep (Invitrogen, K2100-04) et leur élution est réalisée dans de l'eau ultra pure stérile exempte de DNAses et de RNAses. Suite à l'extraction, la concentration plasmidique est quantifiée par dosage de l'ADN à la longueur d'onde 260 nm et sa pureté est vérifiée par les ratios des valeurs d'absorbance pour les longueurs d'onde 260/280 et 260/230 (BMG Labtech, Spectrostar Nano, LVis plate). Ces ratios, lorsque leurs valeurs sont inférieures à 2, indiquent l'absence de contamination par des protéines et par de l'ARN, respectivement.

2.2. Amplification par PCR et conception des amorces

La réaction de *Polymerase Chain Reaction* ou PCR, est une méthode utilisée pour répliquer des fragments d'ADN. Il s'agit, à partir d'une matrice d'ADN double brin, de répliquer le fragment d'intérêt au cours de cycles successifs, ce qui augmente la quantité de produit de façon exponentielle. Les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide du thermocycleur Mastercycler gradient (Eppendorf), dans un volume réactionnel de 50 µL, en tubes PCR de 0,2 mL (Thermo Scientific, 3412B). Le programme d'amplification et le mix réactionnel utilisés au cours de cette étude sont récapitulés au sein des Tableaux 13 et 14 respectivement. Les réactifs nécessaires à la réaction de PCR proviennent du fournisseur *New England Biolabs* (NEB, UK).

| | Etape | Température | Durée |
|---|-------------------------|------------------------------------|-------------|
| 1 | Dénaturation initiale | 98°C | 30 secondes |
| 2 | Dénaturation | 98°C | 10 secondes |
| 3 | Hybridation des amorces | Thybridation | 30 secondes |
| 4 | Elongation | 72°C | Délongation |
| | Répét | tion des étapes 2 à 4 pendant 35 d | cycles |
| 5 | Elongation finale | 72°C | 10 minutes |
| 6 | Conservation | 4°C | ∞ |

Tableau 13 : Etapes de la réaction de PCR

Les valeurs T_{hybridation} et D_{élongation} sont dépendantes du couple d'amorces et de la longueur du fragment synthétisé respectivement. Dans le cadre de cette étude, ces valeurs sont retrouvées au sein du Tableau 15.

| Composant | Volume | Concentration finale |
|------------------------------------|-----------|----------------------|
| Eau exempte de nucléases | Qsp 50 μL | - |
| Tampon Phusion HF 5X (NEB, M0530S) | 10 µL | 1X |
| dNTPs (NEB, N0446S) | 1 μL | 200 µM |
| Amorce Forward | 2,5 μL | 0,5 μΜ |
| Amorce Reverse | 2,5 μL | 0,5 μΜ |
| Matrice ADN à amplifier | Variable | < 250 ng |
| Phusion polymérase (NEB, M0530S) | 0,5 μL | 1 unité |

Tableau 14 : Mix réactionnel utilisé pour les réactions de PCR

La région à amplifier est définie et est bordée par les deux amorces *Forward* et *Reverse*. Elles ont été conçues à l'aide du logiciel pDRAW32 (version 1.1.126) et synthétisées par la société Thermo Fisher Scientific. Préalablement à leur utilisation, les amorces lyophilisées sont réhydratées en présence d'eau sans nucléases de sorte à obtenir une concentration finale de 100 µM. Les amorces utilisées au cours de ces travaux sont présentées sur le Tableau 15.

Tableau 15 : Caractéristiques des amorces utilisées au cours de l'étude

| Région | Nom de l'amorce | | τ | Taille | Délongation |
|-----------|-----------------------|------------------------------------|---------------|--------|-------------|
| amplifiée | (sens) | Sequence (S 7 S) | I hybridation | (pb) | |
| PchrB | PchrB-Mfel (forward) | AAAAAACAATTGGCAGACAGCTTAGCGGG | 62°C | 580 | 20 secondes |
| FCIIID | _chrl-BamHI (reverse) | AAAAAAGGATCCCATCAGGCCGCGATACAAC | 02 C | 580 | 20 secondes |
| luxAB | luxAB-EcoRI (forward) | AAAAAAGAATTCGGAATAGAGTATGAAGTTTGG | FG°C | 2174 | 90 socondos |
| | luxAB-Pstl (reverse) | AAAAAACTGCAGCTCTCCAATAACACCTAATATC | 50 C | 21/4 | ou secondes |

En bleu apparaissent les sites de digestion enzymatiques. Les températures d'hybridation ont été calculées selon les recommandations du fournisseur, données disponibles sur le site http://tmcalculator.neb.com/#!/

2.3. Digestion de l'ADN

Lors de la réaction de clonage, il peut être nécessaire de digérer l'ADN, que ce soit pour isoler le fragment d'intérêt, ou encore pour créer des coupures et des extrémités compatibles à la ligation. Les digestions sont réalisées par des enzymes de restriction, en suivant les recommandations du fabriquant (NEB, UK).

2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

La qualité des fragments d'ADN peut être évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour cela, les fragments d'ADN sont mis à migrer sur un gel d'agarose à 1% (M/V) (Sigma, A9539) en tampon TAE 1X (Thermo Scientific, B49). Avant la migration, du bleu de charge 1X (NEB, B7021S) est ajouté à chaque échantillon d'ADN. De plus, afin d'évaluer la taille des échantillons, un marqueur de taille (NEB, N0468S) est lui aussi ajouté. Les différents échantillons, une fois déposés sur le gel, sont mis à

migrer sous un voltage de 100 V dans une cuve électrophorétique Minigel 2 Apelex (Dominique Dutscher, 049011).

Suite à la migration, le gel est mis à colorer dans un bain de bromure d'éthydium (Prolabo, 33.591.733) à la concentration de 100 µg.L⁻¹, durant 20 minutes à l'obscurité. La visualisation des bandes d'ADN est faite sur une table à ultraviolet (Fisher Bioblock Scientific, TCP-20.M). Une fois la migration réalisée, les fragments d'intérêt sont isolés par découpage du morceau d'agarose correspondant. L'ADN est ensuite extrait de la matrice d'agarose à l'aide du kit *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, 28-9034-70). Enfin, il est élué en eau ultra pure et dosé.

2.5. Purification de l'ADN

Suite à la réplication par PCR ou à la digestion enzymatique, les fragments d'ADN sont purifiés pour s'affranchir des sels et des réactifs. Pour cela, la réaction se fait à l'aide du kit *PureLink PCR purification kit* (Invitrogen, K3100-01) et l'élution des fragments se réalise dans de l'eau exempte de nucléases. De même que pour l'extraction plasmidique, les fragments d'ADN ainsi purifiés peuvent être dosés et être évalués pour leur pureté.

2.6. Ligation

La ligation est une réaction enzymatique permettant la jonction entre deux molécules d'ADN, à savoir le vecteur et l'insert. La réaction se déroule à 16°C pendant 16 heures, le mix réactionnel est composé comme décrit dans le Tableau 16. Les produits de cette réaction de ligation sont directement utilisés pour transformer les bactéries compétentes.

| Composants | Volume | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--|
| Eau exempte de nucléases | Qsp 20 μL | |
| Tampon T4 DNA ligase (NEB, M0202) | 2 μL | |
| Vecteur | Patio incort : voctour dófini à 2 : 1 | |
| Insert | Katio insert . Vecteur denni a 5 . 1 | |
| T4 DNA ligase (NEB, M0202) | 1 μL | |

Tableau 16 : Composition du mix pour une réaction de ligation

Le ratio insert : vecteur de 3 : 1 est calculé selon les recommandations du fabricant, lesquelles sont détaillées dans le site http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation. La formule appliquée pour le calcul de la masse d'insert est la suivante : masse d'insert (g) = 3 x masse du vecteur (g) x masse de l'insert/masse du vecteur.

2.7. Mise en compétence des bactéries et transformation

La compétence bactérienne est un état dans lequel les bactéries peuvent intégrer de l'ADN exogène. La méthode ici utilisée est une méthode chimique : l'action du CaCl₂ froid suivi d'un choc thermique à 42°C permet de générer des nanopores dans la membrane, nécessaires au passage de l'ADN à l'intérieur de la bactérie.

Pour générer des bactéries compétentes, plusieurs étapes sont nécessaires. Suite à la pré-culture de 16 heures, la bactérie est mise en croissance dans du milieu LB à 30°C, à la dilution 1/500 dans 50 mL. Lorsque l'absorbance A_{620nm} atteint 0,3, la croissance bactérienne est stoppée dans la glace. La suspension bactérienne subit alors une première centrifugation (3000 g, 4°C) pendant 5 minutes. Le culot bactérien est de nouveau repris dans 1/2 de volume par du CaCl₂ glacé (Merck, 1.02382.0500) à la concentration de 100 mM. Par la suite, les cellules sont centrifugées à nouveau selon les mêmes conditions. Le culot obtenu est délicatement repris dans 1/10 de volume de CaCl₂ puis conservé pendant deux heures dans la glace. Suite à cette incubation, les bactéries compétentes sont réparties à raison de 100 µL par tube, puis utilisées immédiatement pour la transformation.

Pour la réaction de transformation, 5 μ L de plasmide sont ajoutés aux 100 μ L de bactéries compétentes. Le tube ainsi préparé est mis à incuber 30 minutes dans la glace. Il est ensuite plongé dans un bain thermostaté à 42°C pendant une minute, puis immédiatement replacé dans la glace. Suite à l'addition de 900 μ L de milieu LB et à l'incubation pendant 45 minutes à 37°C, les bactéries transformées sont ensuite sélectionnées par étalement de la suspension sur milieu LB gélosé + antibiotique. Suite à une incubation de 24 heures à 37°C, les clones obtenus sont criblés pour vérifier l'insertion du plasmide. De plus, parallèlement à la réaction de transformation avec le plasmide, une expérience témoin est réalisée avec de l'eau exempte de nucléases. Sauf cette différence, les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites précédemment.

2.8. Criblage des clones recombinants

Les clones obtenus suite à la transformation doivent être criblés et vérifiés. Pour cela, des vérifications phénotypiques sont réalisées via l'étude de l'expression des gènes de bioluminescence. En effet, les souches transformées ont été criblées pour le caractère « bioluminescence inductible » en présence du métal spécifique et ont été testées comme décrit au sein du paragraphe 3.2.2.

3. Bioélément bactérien

3.1. Solutions d'Eléments Traces Métalliques

Les Eléments Traces Métalliques (ETM) sont utilisés pour les essais d'induction des bactéries bioluminescentes et fluorescentes. Des solutions mères de métaux sont préparées en bouteilles brunes et conservées à 4°C, selon les caractéristiques définies dans le Tableau 17. Les solutions filles sont préparées extemporanément avant chaque essai d'induction. Ces solutions d'ETM ont été à la fois utilisées pour les tests de spécificité et de sensibilité des souches bioluminescentes, ainsi que les tests d'induction pour les souches fluorescentes. Pour ces dernières, les concentrations utilisées sont répertoriées dans le Tableau 23, rubrique ETM.

| | Métal | | N/1N/ | | | Masse | Fournis- |
|---------------|-----------------------------------------------------------|------------|------------------------|--------------------|---------|--------------------------|----------|
| Nom | Formule chimique | Numéro CAS | (g.mol ⁻¹) | Solvant | ETM (M) | ajoutée qsp 10 mL (g) | seur |
| Argent | AgNO ₃ | 7385-67-3 | 169,87 | Eau distillée | 1M | 1,6987 | Labogros |
| Arsenic (III) | As ₂ O ₃ | 1327-53-3 | 197,87 | NaOH (2M) | 1M | 0,9894 | Sigma |
| Cadmium | CdCl ₂ , 2,5 H ₂ O | 7790-78-5 | 228,34 | Eau distillée | 1M | 2,2834 | Sigma |
| Chrome (III) | CrCl ₃ , 6 H ₂ O | 10060-12-5 | 266,45 | Eau distillée | 0,5M | 1,3323 | Sigma |
| Chrome (VI) | K ₂ Cr ₂ O ₇ | 7778-50-9 | 294,19 | Eau distillée | 0,5M | 0,7355 | Fluka |
| Cobalt | CoCl ₂ , 6 H ₂ O | 231-589-4 | 237,93 | Eau distillée | 0,1M | 0,2379 | Labosi |
| Cuivre | CuSO4, 5 H ₂ O | 231-847-6 | 249,68 | Eau distillée | 1M | 2,4968 | Labosi |
| Etain | SnCl ₂ , 2 H ₂ O | 10025-69-1 | 225,63 | Ethanol (99,9%) | 0,1M | 0,2256 | Panreac |
| Fer | FeSO ₄ , 7 H ₂ O | 10034-99-8 | 278,01 | Eau distillée | 1M | 2,7801 | Labosi |
| Manganèse | MnCl ₂ , 4 H ₂ O | 13446-34-9 | 197,91 | Eau distillée | 1M | 1,9791 | Sigma |
| Mercure | HgCl ₂ | 7487-94-7 | 271,5 | Eau distillée | 0,1M | 0,2715 | Fluka |
| Nickel | NiSO ₄ , 7 H ₂ O | 10101-98-1 | 280,66 | Eau distillée | 1M | 2,8066 | Prolabo |
| Or | AuCl₃ | 13453-07-1 | 303,33 | Eau distillée | 0,1M | 0,3033 | Sigma |
| Plomb | Pb(CH ₃ COO) ₂ , 3 H ₂ O | 6080-56-4 | 379,33 | Eau distillée | 1M | 3,7933 | Panreac |
| Zinc | ZnCl ₂ | 7646-85-7 | 136,28 | HCl (30 mM) | 1M | 1,3628 | Sigma |

Tableau 17 : Solutions d'ETM mères utilisées au cours de l'étude

3.2. Souches bioluminescentes

3.2.1. Construction des bioéléments

3.2.1.1. Construction du bioélément E. coli pUCChrlux

La construction du bioélément détectant le chrome se déroule en deux étapes : *(i)* l'insertion du fragment *luxAB* codant les gènes de bioluminescence et *(ii)* l'ajout en fusion transcriptionnelle du fragment *chrB*-PchrA.

Dans un premier temps, les gènes de bioluminescence *luxAB* ont été amplifiés par réaction de PCR à partir du plasmide pBmerlux. Suite à la digestion de l'amplicon par *Eco*RI, le fragment produit possède une extrémité 5' en coupure franche et une extrémité 3' en coupure cohésive. Ce fragment est ensuite cloné au sein du plasmide pUC19 doublement digéré par *Eco*RI et *Sfo*I. La ligation de l'insert et du vecteur aboutissent ainsi à la construction du plasmide pUClux (Figure 18).

Dans un second temps, le fragment PchrB est inséré au sein du plasmide pUClux en fusion transcriptionnelle, c'est-à-dire avec la contrainte d'une extrémité 3' possédant un site de coupure compatible avec *Eco*RI. Or, suite à l'analyse de la séquence codante du gène *chrB*, on observe la présence d'un site *Eco*RI. Pour pallier à ce problème, le site de restriction *Mfe*I a été utilisé. En effet, les deux enzymes *Mfe*I et *Eco*RI sont des isocaudomères, c'est-à-dire qu'après la restriction, elles génèrent des extrémités identiques compatibles pour une ligation.

Par la suite, le fragment P*chrB* a été amplifié depuis le mégaplasmide pMOL28. Suite à la digestion de l'amplicon par *Mfe*I, le fragment a été introduit au sein du plasmide pUClux, préalablement digéré par *Eco*RI et *Sma*I. La ligation se réalise ensuite entre les deux couples suivants : *(i)* en 5', l'extrémité 5' en coupure franche et pUClux digéré par *Sma*I ainsi que *(ii)* en 3', l'extrémité digérée par *Mfe*I et pUClux digéré par *Eco*RI. La ligation du promoteur P*chrB* au sein de pUClux a conduit à la construction du plasmide pUCchrlux (Figure 19).

Suite à la transformation du plasmide pUCchrlux dans la bactérie hôte *E. coli* K12 MG1655, le bioélément pour la détection de chrome, nommé *E. coli* pUCchrlux a été obtenu. Le bioélément a ensuite été séquencé pour valider la construction : celui-ci possède bien le fragment d'intérêt en amont des gènes de bioluminescence *luxAB*.

3.2.1.2. Construction des bioéléments E. coli pBpbrlux et E. coli pBgollux

Dans le but de construire une souche répondant spécifiquement à la présence de plomb, la région codant la protéine régulatrice PbrR ainsi que le promoteur inductible au plomb P*pbrA* a été clonée en amont des gènes rapporteurs bioluminescents. De même, la souche détectant l'or doit posséder le gène *golS* en aval de son promoteur P*golTS* en plus du promoteur P*golB*, en fusion transcriptionnelle avec les gènes de bioluminescence.

Une fois la stratégie établie, la construction des deux souches détectrices de plomb et d'or a été réalisée par la société GenScript (USA). Ce choix a été fait suite aux difficultés rencontrées pour la construction de la souche chrome. Suite à la synthèse et au séquençage de l'ADN correspondant à la région d'intérêt, celui-ci a été intégré au sein du plasmide pBmerlux en amont des gènes de bioluminescence *luxCDABE*, en remplacement du promoteur *merR-Pmer* initialement présent. Ceci a conduit à la construction des deux plasmides pBpbrlux et pBgollux. Une fois leurs séquences vérifiées, les plasmides ont été transformés dans la bactérie *E. coli*. Ceci a conduit aux bioéléments nommés *E. coli* pBgollux et *E. coli* pBgollux pour la détection de plomb et d'or respectivement (Figure 20 et Figure 21).



Figure 18 : Etapes de la construction du plasmide pUClux

Légendes des cartes plasmidiques : Les flèches $\stackrel{r}{\blacktriangleright}$ correspondent aux séquences codantes, les encadrés verts correspondent à l'origine de réplication et les encadrés bleus correspondent aux séquences promotrices. Les annotations en bleu correspondent aux sites de restriction enzymatique (nom – position – site de reconnaissance) et en violet apparaissent les amorces (nom – position de la coupure).



Figure 19 : Etapes de la construction du plasmide pUCchrlux

Légendes des cartes plasmidiques : Les flèches $\stackrel{r}{\Rightarrow}$ correspondent aux séquences codantes, les encadrés verts correspondent à l'origine de réplication et les encadrés bleus correspondent aux séquences promotrices. Les annotations en bleu correspondent aux sites de restriction enzymatique (nom – position – site de reconnaissance) et en violet apparaissent les amorces (nom – position de la coupure).



Figure 20 : Etapes de la construction du plasmide pBpbrlux

Légendes des cartes plasmidiques : Les flèches $\stackrel{r}{\Rightarrow}$ correspondent aux séquences codantes, les encadrés verts correspondent à l'origine de réplication, les encadrés bleus correspondent aux séquences promotrices et les encadrés orange correspondent aux séquences insérées. Les annotations en bleu correspondent aux sites de restriction enzymatique (nom – position – site de reconnaissance).



Figure 21 : Etapes de la construction du plasmide pBgollux

Légendes des cartes plasmidiques : Les flèches $\stackrel{\bullet}{\rightarrow}$ correspondent aux séquences codantes, les encadrés verts correspondent à l'origine de réplication, les encadrés bleus correspondent aux séquences promotrices et les encadrés orange correspondent aux séquences insérées. Les annotations en bleu correspondent aux sites de restriction enzymatique (nom – position – site de reconnaissance).

3.2.2. Induction des souches bioluminescentes

3.2.2.1. En présence de bactéries fraiches

Suite à une pré-culture de 16 heures à partir de cryotubes, les souches sont remises en culture jusqu'à atteindre une absorbance $A_{620nm} = 0,45$. Cette suspension bactérienne est ensuite diluée de sorte à obtenir une absorbance $A_{620nm} = 0,075$. Cent microlitres de cette suspension sont ensuite mis en présence de 25 µL d'échantillon à tester. Suite à une incubation à 30°C, étape au cours de laquelle la synthèse protéique se réalise, la bioluminescence est mesurée.

Le protocole d'induction de la souche *E. coli* pUCchrlux est différent. Cette souche ne possédant que les gènes *luxAB*, l'aldéhyde substrat de l'enzyme luciférase n'est pas synthétisé. Ainsi, il est ajouté sous forme de décanal à une concentration finale de 30 μ M, juste avant la mesure de bioluminescence.

La solution mère de décanal est réalisée à la concentration de 175 μ M (Sigma, D7384) additionné de 1,6% (V/V) d'isopropanol. La solution de décanal n'est pas conservée et est renouvelée avant chaque essai d'induction. La durée d'induction des différentes souches est variable.

3.2.2.2. En présence de bactéries lyophilisées

Les bactéries lyophilisées sont préalablement réhydratées par 100 μ L d'eau distillée stérile. A l'issue de la revivification bactérienne de 30 minutes à 30°C, l'échantillon à tester est ajouté à hauteur de 25 μ L par puits. Enfin, suite à une incubation pendant 1 heure à 30°C, la mesure de bioluminescence est effectuée.

3.2.3. Mesure et analyse des résultats de bioluminescence

La bioluminescence est mesurée à l'aide du luminomètre MicroLumat Plus LB96V (Berthold Technologies). Les paramètres appliqués à la mesure sont les suivants : la chambre d'incubation est thermostatée à 30°C et le temps d'intégration par puits est de 1 seconde.

Pour l'analyse de la bioluminescence, deux paramètres sont en prendre en compte. Pour les souches qui expriment constitutivement le gène rapporteur, il s'agit de calculer un Taux d'Inhibition (TI) et de quantifier la diminution de la production de bioluminescence par rapport à la condition témoin non exposé aux échantillons. Pour les souches inductibles, il s'agit de calculer un Facteur d'Induction (FI) et de quantifier la bioluminescence produite en réponse à l'échantillon, par rapport à une condition témoin. La formule appliquée pour le calcul du Taux d'Inhibition (TI) est la suivante :

$$TI = \frac{RLU_{t\acute{e}moin} - RLU_{essai}}{RLU_{t\acute{e}moin}} \ge 100$$

Avec :

- TI : Taux d'Inhibition
- RLU : Relative Luminescence Unit
- RLU essai : valeur de RLU pour la bactérie en présence de l'échantillon
- RLU témoin : valeur de RLU pour la bactérie en présence du témoin négatif

De plus, le calcul du Facteur d'Induction (FI) est réalisé selon la formule suivante :

$$FI = \frac{RLU_{essai}}{RLU_{témoin}}$$

Avec :

- FI : Facteur d'Induction
- RLU essai : valeur de RLU pour la bactérie en présence de l'échantillon
- RLU témoin : valeur de RLU pour la bactérie en présence du témoin négatif

Le promoteur est considéré comme activé lorsque son FI est supérieur ou égal à 2 (Tauriainen et al. 1997; Ivask et al. 2002).

3.3. Souches fluorescentes

3.3.1. Induction des souches fluorescentes

Pour les souches fluorescentes, une pré-culture est réalisée à 37°C dans un volume final de 200 μ L. Après 16 heures d'incubation, les souches bactériennes sont réensemencées à la dilution 1 : 10, dans un volume final de 100 μ L. Les bactéries, préalablement à l'exposition, sont incubées pendant 2 heures à 37°C, de manière à entrer en phase exponentielle de croissance. Suite à l'induction des bactéries avec 25 μ L d'échantillon, elles sont ensuite incubées pendant 3 heures supplémentaires, afin de permettre le déroulement des réactions physiologiques et la production de fluorescence. Enfin, la fluorescence et l'absorbance bactérienne sont mesurées. Ainsi, l'ensemble de ces étapes ont été réalisées dans une seule et unique phase de croissance bactérienne, à savoir la phase exponentielle (Figure 22).



Figure 22 : Cinétique de croissance de la souche E. coli U139

Culture en milieu HEPES à 37°C. Modélisation de la linéarité de la croissance bactérienne pendant la phase exponentielle de croissance.

3.3.2. Mesure et analyse des résultats de fluorescence et d'absorbance

La mesure de fluorescence est effectuée à la longueur d'onde de 485 nm en excitation et de 535 nm en émission. La mesure d'absorbance est réalisée à la longueur d'onde de 620 nm. Ces deux mesures se font à l'aide de l'appareil Spark 10M (Tecan). Ces mesures sont réalisées dans des microplaques noires à fond transparent (Dominique Dutscher, 655090).

Le calcul du Facteur d'Induction pour les souches fluorescentes sera réalisé comme décrit selon le Chapitre 4, paragraphe 2.3. Il prendra en compte les variations de fluorescence et d'absorbance, à la fois des souches témoins et des souches essai. Ce calcul permettra par la suite de définir si le gène *x* est activé ou réprimé par rapport à la condition témoin.

4. Analyses des données

4.1. Analyse des données de bioluminescence par arbres de décision

L'analyse des données de bioluminescence et la semi-quantification des métaux a été réalisée par le biais d'arbres de décision développés précédemment au laboratoire (Jouanneau 2011). Ceux-ci ont été construits sur la base du couplage des réponses en bioluminescence des quatre souches détectrices *E. coli* pBarslux, *E. coli* pBcoplux, *E. coli* pBmerlux et *E. coli* pBzntlux. Les arbres dédiés à la détection des quatre métaux arsenic, cuivre, mercure et cadmium sont représentés sur la Figure 23.









Figure 23 : Arbres de décision dédiés à la détection des métaux arsenic (A), cuivre (B), mercure (C) et cadmium (D) Les concentrations 0, LD ou MD d'arsenic sont définies au sein du Tableau 18. Les souches Arslux, Zntlux et Taclux correspondent respectivement aux souches *E. coli* pBarslux, *E. coli* pBzntlux et *E. coli* pBtaclux. Les valeurs de segmentation pour chacun des arcs correspondent aux valeurs de log(FI) pour les souches inductibles ou bien à la valeur d'inhibition de la bioluminescence pour la souche constitutive. Issu de Jouanneau (2011).

| Métal | 0 | LD | MD | тох |
|---------|--------------|------------------|-------------|--------------------|
| Arsenic | [0 ; 0,5[| [0,5 ; 5[| [5 ; 500[| [500 ; + ∞[|
| Cuivre | [0 ; 5[| [5 ; 50[| [50 ; 5000[| [5000 ; +∞[|
| Mercure | [0 ; 0,0005[| [0,0005 ; 0,005[| [0,005 ; 5[| [5 ; +∞[|
| Cadmium | [0;0,025[| [0,025 ; 0,25[| [0,25 ; 50[| [50 ; +∞[|
| | | | - / | |

Tableau 18 : Gammes de détection des métaux d'après l'approche par arbres de décision

D

Avec 0 : absence de détection, LD : Limite de Détection, MD : Maximum de Détection et TOX : TOXique. Issu de Jouanneau (2011).

4.2. Traitement statistique des données de fluorescence

Pour assurer un traitement des données homogène, les valeurs de fluorescence sont normalisées. Les valeurs de répression, initialement comprises entre]0; 0,5] sont comprises entre [-100; 0[. De même, les valeurs d'activation initialement bornées entre $[2; +\infty[$ sont actuellement comprises entre]0; +100]. L'étendue des intervalles pour la répression et l'activation sont égales, permettant ainsi d'affecter un poids identique aux deux sens de régulation. La normalisation est réalisée pour l'ensemble des conditions et l'ensemble des gènes. L'ensemble des analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Matlab version 2012b, via l'utilisation de la toolbox *Statistics* et du package Saisir (Cordella and Bertrand 2014). Les modèles issus des Analyses Factorielles Discriminantes (AFD) sont établis par une validation croisée. Une sélection aléatoire utilise 2/3 des données pour calibrer le modèle, tandis que les 1/3 restants servent de validation a posteriori de celui-ci. Les résultats sont qui représentés sur les graphiques correspondent à une moyenne de 100 itérations (Quackenbush 2006).

5. Description de l'ensemble des échantillons environnementaux

5.1. Description des échantillons

Au cours de ces travaux, deux types d'échantillons ont été étudiés. Il s'agit soit d'échantillons contaminés au laboratoire de concentrations connues, ou bien d'échantillons environnementaux pour lesquels les métaux ont été dosés par analyses chimiques. Les différents échantillons étudiés seront tour à tour décrits dans les paragraphes suivants ainsi que dans le Tableau 19.

| Type d'échantillon | Description | Référencement | Nombre d'échantillons | Nature de la matrice |
|------------------------------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|
| Echantillons caractérisés de laboratoire | Métaux en eau distillée | E | 18 + 1 | Liquide |
| | Métaux en eau de rivière | R | 4 | Liquide |
| Echantillong | Boue | Ref-Boue | 1 | Solide |
| environnementaux | Sédiments | Ref-Sed | 2 | Solide |
| environmentaux | Terre | Т | 6 | Solide |
| | Solvay | Sol | 4 | Liquide |
| | Bois | В | 6 | Solide |

Tableau 19 : Récapitulatif des caractéristiques des échantillons

5.1.1. Echantillons métalliques contaminés au laboratoire

5.1.1.1. Echantillons en eau distillée (E)

Pour les métaux en eau distillée, trois concentrations C1, C2 et C3 ont été utilisées. Elles correspondent respectivement à une concentration non toxique, une concentration à la limite de toxicité, ainsi qu'une concentration entrainant 25% d'inhibition de croissance. Leurs concentrations sont notées au sein du le Tableau 23, rubrique Métaux en eau distillée (E).

5.1.1.2. Echantillons en eau de rivière (R)

Des échantillons environnementaux contaminés par des concentrations connues de métaux ont aussi été préparées. Pour cela, de l'eau de la rivière Yon (ville de La Roche sur Yon, coordonnées GPS 46.676493, -1.408744) a été prélevée, filtrée sur membrane de porosité 0,22 µm (Millipore, référence GVWP04700) puis contaminée en laboratoire avec des concentrations connues de métaux. Leurs concentrations sont décrites dans le Tableau 23, rubrique Métaux en eau de rivière (R).

5.1.2. Echantillons environnementaux

5.1.2.1. Echantillons dits de référence (Ref)

Un échantillon de boue (Sigma, CRM009) et deux échantillons de sédiment (Techlab, références NCS DC 73 022 et NCD DC 73 317A respectivement) ont été étudiés. Leurs concentrations en métaux dans la matrice initiale sont reportées dans le Tableau 20. Il est à noter que les échantillons Ref-Sed1 et Ref-Sed2 présentent des contaminations à plus de 60 métaux différents, mais seuls ceux qui sont d'intérêt pour cette étude ont été reportées. De plus, leurs teneurs après lixiviation des échantillons sont répertoriés dans le Tableau 23, rubrique Echantillons de référence (Ref).

| Métal (µM) | Boue (Ref-Boue) | Sédiment 1 (Ref-Sed1) | Sédiment 2 (Ref-Sed2) |
|------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| Argent | 8,25 | 1,95 | 1,11 |
| Arsenic | 0 | 405,76 | 15,08 |
| Cadmium | 0 | 4,27 | 4,98 |
| Chrome | 96,74 | 138,47 | 82,70 |
| Cobalt | 0 | 24,43 | 25,79 |
| Cuivre | 190413,24 | 760,08 | 35,41 |
| Mercure | 0 | 0,06 | 0,84 |
| Plomb | 6853,28 | 60,81 | 267,86 |
| Zinc | 0 | 1336,80 | 1193,03 |

Concentrations en μM de métal dans les conditions de lixiviation.

5.1.2.2. Echantillons de terre (T)

Les échantillons de terre sont issus d'une étude de processus de dépollution des sols, fournis par la société Greenation. Il y a une parcelle Témoin, pour lequel aucun traitement n'est appliqué et deux parcelles Indoor et Neobab, correspondant à deux traitements de dépollution différents. Enfin, pour l'ensemble de ces échantillons, deux campagnes de prélèvements ont été réalisées, à savoir le 31/05/16 ainsi que le 13/07/16. Les teneurs en métaux des lixiviats correspondants sont répertoriés au sein du Tableau 23, rubrique Echantillons de terre (T).

5.1.2.3. Echantillons industriels Solvay (Sol)

Les quatre échantillons Solvay décrivent le processus de décontamination d'eau de process, entre les eaux de sortie de fabrication (échantillon Sol-DCE), l'entrée du process de traitement (échantillon Sol-N008), l'étape de traitement (échantillon Sol-BoueB), ainsi que la sortie du traitement (échantillon Sol-N809) (Figure 24).



Figure 24 : Schéma du procédé de traitement des échantillons Solvay

Dans le processus, l'ensemble des échantillons DCE, MGC, EPI, PVDF et IXAN sont mélangés au sein du réacteur N008. Ce dernier subit alors un traitement de décontamination biologique au sein du bassin Boue biologique, pour être *in fine*, rejeté au niveau de la sortie N809.

Les caractéristiques de ces échantillons sont retrouvées dans le Tableau 21. Leurs concentrations en métaux sont quant à elles référencées dans le Tableau 23, rubrique Echantillons Solvay.

| Echantillon | DCO (mg.L ⁻¹) | COT (mg(C).L ⁻¹) |
|-------------|---------------------------|------------------------------|
| Sol-DCE | 2 441 | 1 292 |
| Sol-N008 | 7 812,8 | 415,3 |
| Sol-BoueB | Non mesurable | 95,7 |
| Sol-N809 | 103 | 25,1 |

5.1.2.4. Echantillons de bois (B)

Les échantillons de bois se présentent sous la forme de mouture de granulométrie inférieure à 500 μ m. Nous disposons de :

- Deux échantillons de bois artificiellement contaminés au laboratoire (échantillons B-020 et B-051). Leurs teneurs en éléments métalliques sont référencées dans le Tableau 22.
- Quatre échantillons environnementaux, pour lesquels la contamination au sein de la matrice est inconnue (échantillons B-BR1, B-BC4, B-CCA2 et B-BC2).

| Métal (µM) | B-020 | B-051 |
|------------|--------|-------|
| Argent | Nd | Nd |
| Arsenic | Nd | 6,06 |
| Cadmium | 30,25 | Nd |
| Chrome | 0 | 43,31 |
| Cobalt | Nd | Nd |
| Cuivre | 108,58 | 30,12 |
| Mercure | Nd | Nd |
| Plomb | 0 | 49,49 |
| Zinc | 3195,2 | Nd |

Tableau 22 : Concentrations de métaux retrouvées au sein des échantillons de bois

Nd : Non déterminé. Concentrations en µM de métal dans les conditions de lixiviation.

Pour ces échantillons, le dosage des métaux dans les lixiviats n'a pas pu être réalisé, du fait de la quantité insuffisante d'échantillon (100 mL sont nécessaires pour réaliser l'ensemble des analyses).

Il est à noter une légère absorbance de ces échantillons à 496 nm, à savoir la longueur d'onde à laquelle la bioluminescence est émise. Dans le cas du calcul du taux d'inhibition de croissance (TI) ou bien du facteur d'induction (FI), la luminescence de l'échantillon (RLU_{essai}) est rapportée à la luminescence du témoin (RLU_{témoin}) (cf. Matériel et méthodes 2, paragraphe 3.2.3). Or, du fait que l'échantillon témoin relatif à l'échantillon essai (*i.e.* le même échantillon de bois exempt de contamination) soit impossible à obtenir dans le cas d'échantillons environnementaux, les valeurs de TI et de FI sont mal évaluées. Ceci conduit à une légère sous-estimation de la toxicité globale et à une légère surestimation de la concentration des métaux, mais qui restent néanmoins négligeables et acceptables.

5.2. Concentrations en métaux de chacun des échantillons

Les concentrations en métaux pour l'ensemble des échantillons sont retrouvées au sein du Tableau 23.

Les échantillons de mélanges de métaux (E-Mélange, R-Cop-Cad et R-Cad-Cop) présentent une concentration équivalente à la concentration C2, c'est-à-dire à la limite de la toxicité en inhibition de croissance. De plus, l'absence de toxicité des échantillons environnementaux inconnus est vérifiée par réalisation d'un test d'inhibition de croissance.

| Nom | рН | Arsenic | Cuivre | Mercure | Cadmium | Zinc | Plomb | | | | | |
|-----------------------------|------|---------|---------------|----------------|---------|---------|---------|--|--|--|--|--|
| Métaux en eau distillée (E) | | | | | | | | | | | | |
| E-C1-Ars | | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C1-Cop | 6,5 | 0 | 250 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C1-Mer | | 0 | 0 | 0,25 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C1-Cad | | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C1-Znt | | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 | | | | | |
| E-C1-Pbr | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | | | | | |
| E-C2-Ars | | 505 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C2-Cop | | 0 | 1 405 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C2-Mer | | 0 | 0 | 2,5 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C2-Cad | | 0 | 0 | 0 | 650 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C2-Znt | | 0 | 0 | 0 | 0 | 250 | 0 | | | | | |
| E-C2-Pbr | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 525 | | | | | |
| E-C3-Ars | | 1 915 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C3-Cop | | 0 | 1 450 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C3-Mer | | 0 | 0 | 2,65 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C3-Cad | | 0 | 0 | 0 | 905 | 0 | 0 | | | | | |
| E-C3-Znt | | 0 | 0 | 0 | 0 | 300 | 0 | | | | | |
| E-C3-Pbr | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 320 | | | | | |
| E-Mélange | | 12,5 | 125 | 0,12 | 1,2 | 12,5 | 12,5 | | | | | |
| | | ſ | Métaux en ea | u de rivière (| R) | | | | | | | |
| R-C2-Cop | | 0 | 950 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| R-C2-Cad | 7,8 | 0 | 0 | 0 | 530 | 0 | 0 | | | | | |
| R-Cad-Cop | | 0 | 303 | 0 | 132,5 | 0 | 0 | | | | | |
| R-Cop-Cad | | 0 | 950 | 0 | 800 | 0 | 0 | | | | | |
| | | Ec | hantillons de | e référence (R | ef) | | | | | | | |
| Ref-Boue | 7,7 | < 0,066 | 5 309 | < 0,002 | < 0,017 | 0,198 | 171,3 | | | | | |
| Ref-Sed1 | 8 | 0,409 | 0,676 | < 0,002 | < 0,017 | 0,191 | < 0,009 | | | | | |
| Ref-Sed2 | 4,6 | 0,084 | 0,291 | 0,008 | < 0,017 | 0,386 | 0,119 | | | | | |
| | | | Echantillon | s de terre (T) | | | | | | | | |
| T-Témoin1 | 7,8 | 0,265 | 3,682 | 0,009 | < 0,017 | 7,494 | 0,892 | | | | | |
| T-Indoor1 | 7,9 | 0,293 | 3,619 | 0,009 | < 0,017 | 8,412 | 1,225 | | | | | |
| T-Neobab1 | 7,9 | 0,244 | 3,949 | 0,008 | < 0,017 | 6,944 | 0,772 | | | | | |
| T-Témoin2 | 7,9 | 0,265 | 3,855 | 0,026 | < 0,017 | 11,31 | 0,936 | | | | | |
| T-Indoor2 | 7,8 | 0,272 | 3,005 | 0,013 | < 0,017 | 7,051 | 0,984 | | | | | |
| T-Neobab2 | 7,9 | 0,197 | 3,902 | 0,001 | < 0,017 | 9,238 | 0,926 | | | | | |
| Echantillons Solvay (Sol) | | | | | | | | | | | | |
| Sol-DCE | 12,2 | 0,172 | 10,24 | 0,002 | < 0,017 | 0,422 | < 0,009 | | | | | |
| Sol-N008 | 5,6 | < 0,066 | 3,273 | < 0,002 | < 0,017 | 0,145 | 0,024 | | | | | |
| Sol-BoueB | 7,9 | < 0,066 | 0,541 | 0,001 | < 0,017 | 0,201 | 0,238 | | | | | |
| Sol-N809 | 8,3 | < 0,066 | 0,316 | < 0,002 | < 0,017 | < 0,007 | < 0,009 | | | | | |

Tableau 23 : Métaux retrouvés au sein des échantillons liquides ou des lixiviats des échantillons solides

| Nom | рН | Arsenic | Cuivre | Mercure | Cadmium | Zinc | Plomb | | | | |
|--------------------------|-----|---------|--------|---------|---------|------|-------|--|--|--|--|
| Echantillons de bois (B) | | | | | | | | | | | |
| B-020 | 8,1 | - | - | - | - | - | - | | | | |
| B-051 | 8,0 | - | - | - | - | - | - | | | | |
| B-BR1 | 4,5 | - | - | - | - | - | - | | | | |
| B-BC2 | 4,5 | - | - | - | - | - | - | | | | |
| B-CCA2 | 4,8 | - | - | - | - | - | - | | | | |
| B-BC4 | 4,2 | - | - | - | - | - | - | | | | |

Tableau 23 : Métaux retrouvés au sein des échantillons liquides ou des lixiviats des échantillons solides (suite)

Concentrations en μ M de métal. Le dosage a été réalisé par le Laboratoire de la Vendée, à l'aide de techniques de chimie analytique (ICP-MS). Dans le cas des échantillons de bois, le dosage n'a pas pu être réalisé faute d'un volume d'échantillon suffisant.

5.3. Lixiviation des échantillons contenus en matrice solide

Afin d'étudier la présence des contaminants dans les échantillons en matrices solides (Ref-Boue, Ref-Sed, T et B), ceux-ci ont été lixiviés, c'est-à-dire qu'ils ont été soumis à un lessivage par un solvant aqueux. La lixiviation a été réalisée durant 24 heures à température ambiante sur un agitateur à plateforme (Heidoph promax 1020), permettant une agitation en va et vient à une fréquence de 200 mouvements par minute. La lixiviation se fait en bouteilles de 1 L (Grosseron, 0295408), avec un ratio de 1 : 10, c'est-à-dire 20 g de solide en présence de 200 mL d'eau ultra pure. Afin de s'affranchir de la présence de particules contenus dans les lixiviats, ceux-ci subissent une série de deux centrifugations (5 minutes, 6 000 g). Le lixiviat est ensuite conservé en aliquots à –20°C jusqu'à utilisation. Les échantillons initialement liquides (E, R et Sol) sont étudiés directement sans l'étape de lixiviation.

CHAPITRE 3 : EVALUATION DE LA TOXICITE D'ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX A L'AIDE DE BIOELEMENTS BACTERIENS

1. Introduction

Dans ce chapitre, la toxicité d'échantillons environnementaux est évaluée à l'aide de bioéléments bactériens. Alors qu'au laboratoire ont été développées quatre souches détectrices ainsi que les analyses statistiques adéquates pour l'identification et la semi-quantification de quatre métaux, cette approche est néanmoins limitée par le nombre de métaux détectés. C'est pour cela que dans un premier temps, trois bioéléments supplémentaires dédiés à la détection du chrome, du plomb, ainsi que de l'or ont été construits puis caractérisés. Dans un second temps, le couplage des réponses de l'ensemble du panel de souches détectrices a été réalisé pour caractériser la contamination métallique d'échantillons environnementaux. La difficulté liée à la réalisation de ces travaux concerne l'applicabilité de cette technique sur des matrices complexes, à savoir des échantillons solides tels que le bois ou la terre, en plus d'échantillons liquides tels que les rejets d'industrie chimique.

1.1. Résistance au chrome

La résistance au chrome est présente au sein de la bactérie environnementale *Cupriavidus metallidurans* CH34. Il s'agit d'une souche bactérienne issue du sol, possédant de nombreuses résistances aux ETM (Mergeay et al. 2003). La résistance au chrome est médiée par le cluster *chrIBACEF* présent sur le mégaplasmide pMOL28.

Deux mécanismes de résistance au chrome sont décrits : un premier mécanisme de protection contre le stress oxydant et un second mécanisme d'efflux du chrome à travers la membrane.

- 1) Une fois à l'intérieur de la cellule, le Cr(VI) est rapidement réduit en Cr(III). Cette réaction entraine la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant provoquer des altérations de l'ADN. Dans ce contexte, la résistance au chrome se produit par la protection contre ces molécules. L'implication de deux protéines sont mises en évidence : la protéine ChrC codant pour une superoxide dismutase et la protéine ChrE, responsable du clivage des complexes chrome-glutathion.
- 2) En présence d'un excès de chrome, celui-ci est exporté hors de la cellule via un système de transport actif, à savoir la pompe à efflux ChrA. Son activité est contrôlée par deux régulateurs inductibles : la protéine activatrice ChrB et la protéine répresseur ChrF. Le rôle de ces deux protéines, en plus de la protéine ChrI ne sont pas détaillés dans la littérature (Figure 25) (Nies et al. 1989; Juhnke et al. 2002; Ramírez-Díaz et al. 2008).



Figure 25 : Gènes impliqués dans la résistance au chrome chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 Les flèches rouge correspondent aux promoteurs inductibles, la flèche violette correspond au promoteur constitutif et la flèche orange correspond au transcrit synthétisé. aa : acides aminés.

Un premier bioélément détectant le chrome a été construit par Peitzsch et al. (1998). Basé sur l'utilisation d'un transposon contenant le gène rapporteur *lacZ* inséré entre les gènes *chrB* et *chrA*, cette souche détecte le chrome sous ses formes hexavalente et trivalente. De plus, cette réponse est dose dépendante et une production de ß-galactosidase est observée pour des concentrations de chrome comprises entre 1 nM et 50 μ M. De plus, aucune détection des métaux nickel, cobalt, zinc ou cadmium n'est observée.

Un autre bioélément détectant le chrome a aussi été construit par Ivask et al. (2002). Pour se faire, le plasmide contenant le fragment *chrB*-P*chrA* a été fusionné en amont du gène de luminescence *luc*, puis transformé au sein de la bactérie *Cupriavidus metallidurans* AE104, bactérie ne possédant pas les deux plasmides pMOL28 et pMOL30. La souche rapportrice ainsi construite possède une spécificité de détection du chrome sous les formes hexavalente et trivalente, avec des limites de détection de 30 nM et 1,5 µM respectivement. Aucune détection de l'arsenic ni de molybdate n'ont été observées. La détection des métaux a été réalisée en présence de souches lyophilisées et la mesure de bioluminescence se réalise 30 minutes après l'ajout du substrat enzymatique luciférine.

1.2. Résistance au plomb

La résistance au plomb est observée chez la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 et est médiée par les gènes *pbr* présents sur le mégaplasmide pMOL30.

Les gènes responsables de la résistance au plomb sont codés par le cluster *pbrTRABCD*. Ces gènes sont responsables de l'importation, du transport et de la séquestration des ions Pb²⁺. La protéine PbrT est un transporteur permettant l'import du plomb au niveau cytoplasmique, au sein duquel il est séquestré par la protéine PbrD. PbrA, une ATPase de type P_{1-B}, assure l'export du cation. La protéine PbrB est une lipoprotéine membranaire et la protéine PbrC est une lipoprotéine signal permettant la maturation de PbrB. Ces deux dernières protéines sont impliquées dans le transport du plomb vers l'espace extracellulaire (Figure 26).



Figure 26 : Gènes et mécanisme de résistance au plomb chez Cupriavidus metallidurans CH34

Ce modèle implique PbrT pour le transport du plomb dans le cytoplasme, PbrD pour la séquestration du plomb dans le cytoplasme, PbrA pour l'efflux du plomb vers l'espace cytoplasmique ainsi que PbrB et sa protéine maturatrice PbrC pour le transport du plomb vers l'espace extracellulaire.

Issu de Borremans et al. (2001).

Le mécanisme de résistance médié par la pompe à efflux PbrA est soumis à la régulation par PbrR, régulateur transcriptionnel appartenant à la famille MerR. En absence de plomb, PbrR se lie sur la région promotrice/opératrice (p/o), entrainant une distorsion de l'ADN. Sous cette configuration, l'ARN polymérase est inactive. En présence de plomb au niveau cytoplasmique, les protéines PbrR vont préférentiellement se complexer avec ces derniers. Le complexe protéine/métal va entrainer la

libération et l'ouverture de la région p/o, entrainant dès lors la fixation de la polymérase et la transcription des deux transcrits en sens opposés. Ce mécanisme de résistance est identique à celui retrouvé pour le mercure par les protéines MerR et le promoteur P*merT*, comme l'indique la similarité de leurs régions promotrices/opératrices (Figure 27) (Borremans et al. 2001).



Figure 27 : Mécanisme d'efflux du plomb chez *Cupriavidus metallidurans* **CH34** Les flèches orange correspondent aux transcrits synthétisés. p/o : région promotrice/opératrice.

Dans l'étude menée par Hynninen et al. (2009), il a été montré que dans une souche exempte de systèmes de résistance aux métaux, la présence de la région *pbrR-PpbrA* est suffisante à la résistance au plomb. De plus, ce mécanisme de résistance ne se limite pas qu'au plomb, puisqu'il permet l'augmentation de la résistance aux ions zinc et cadmium d'un facteur 16 et 128 respectivement. Cependant, en présence d'autres systèmes de résistance présents dans le génome bactérien, par exemple, la protéine CadA chez la bactérie *Staphylococcus aureus* pour l'efflux de cadmium, les gènes *pbr* ne contribuent pas à la résistance à ces métaux. En effet, le transport de ces ions métalliques par la pompe PbrA, peu efficace mais également couteux en énergie, n'est pas privilégié par la cellule.

Un bioélément détectant le plomb a été construit par Wei et al. (2014). Transformé au sein de la bactérie *E. coli*, le plasmide portant le fragment *pbrR-PpbrA-gfp* permet la détection du plomb. Cette détection est dose dépendante, avec une limite de détection proche de 0,1 μ M de plomb. De plus, les métaux cadmium et zinc ne sont pas détectés dans ces conditions.

1.3. Résistance à l'or

La résistance à l'or est portée par la bactérie *Salmonella enterica* sérovar typhimurium. Elle est basée sur trois gènes : le gène *golT* pour « <u>Transport</u> », le gène *golB* pour « <u>Binding</u> », ainsi que le gène *golS* pour « <u>Sensor</u> ». Ce dernier permet la spécificité de détection des ions or.

En absence de métal, la protéine régulatrice GolS se lie sur le promoteur P*golTS*. On observe alors un changement de conformation de l'ADN, conduisant à une configuration inactive de l'ARN polymérase, provoquant une absence de transcription. En présence des ions métalliques, la protéine GolS va se lier au métal. La libération du promoteur ainsi que l'ouverture du site de la polymérase lui permet alors d'être active et de transcrire les gènes *golTS* (Figure 28) (Checa and Soncini 2010).



Figure 28 : Gènes impliqués dans la résistance à l'or chez Salmonella typhimurium

Les flèches rouge correspondent aux promoteurs inductibles et la flèche orange correspond au transcrit synthétisé.

Un bioélément destiné à la détection de l'or a été construit par Checa et al. (2007). La souche *E. coli* possède une fusion transcriptionnelle entre le promoteur P*golB* et les gènes *lacZ*. Ce bioélément détecte les métaux du groupe IB (cuivre, argent et or, en ordre croissant d'induction), mais pas ceux du groupe IIB (zinc, cadmium et mercure), ni ceux du groupe VIIIB (fer, cobalt et nickel).

Ces résultats ont été confirmés et approfondis par l'étude réalisée par Cerminati et al. (2011). Dans ces travaux, deux types de constructions ont été réalisées. La première souche contient le promoteur *PgolB* et possède une spécificité de réponse pour les ions cuivre et or. La seconde souche possède, en plus du promoteur *PgolB*, la protéine régulatrice GolS (fragment *golS*-*PgolB*). Pour cette dernière, seule la détection de l'or est observée. Ainsi, la spécificité de détection de l'or est conférée par la présence de la protéine GolS. Pour ce cation, la limite de détection est de 33 nM avec un maximum de réponse en présence de 471 nM de métal.

Basés sur ces mécanismes de résistance, les trois souches dédiées à la détection du chrome, du plomb et de l'or ont été construites (cf. Matériel et méthodes, paragraphe 3.2.1). Leurs spécificités de détection ainsi que leurs sensibilités sont dans un premier temps étudiées.

2. Résultats et discussion

2.1. Caractérisation des bioéléments bioluminescents construits

Suite à la construction des souches bactériennes, celles-ci ont été caractérisées. Des études portent dans un premier temps sur la détermination de la durée optimale d'incubation en présence du métal et dans un second temps, sur la spécificité de détection pour un ensemble de 15 métaux (Matériel et méthodes, Tableau 17). Ces études sont dans un premier temps réalisées sur les bactéries en conditions fraiche, puis, dans un second temps, sur bactéries lyophilisées. En effet, avec la perspective d'une application rapide de terrain, les bioessais bactériens ne peuvent pas être utilisés en conditions fraiches.

2.1.1. Spécificités du bioélément E. coli pUCchrlux

2.1.1.1. En présence de bactéries fraiches

En présence de bactéries fraiches, le bioélément permet la détection du chrome sous sa forme trivalente uniquement. Pour ce métal, la réponse de la souche est concentration dépendante, et atteint un maximum de production de bioluminescence à 100 μ M avec un facteur d'induction de 97,9 (Figure 29). Au contraire, les facteurs d'induction de la souche en présence de chrome

hexavalent ne dépassent pas la valeur de 2 quelque soit la concentration de métal (résultats non présentés). Ainsi, cette souche est très spécifique et la détection est dépendante du degré d'oxydation du métal.



Figure 29 : Caractérisation de la bactérie *E. coli* **pUCchrlux en condition fraiche en réponse au chrome trivalent** Bactéries fraiches induites en présence de chrome (III). Incubation de 30 minutes et injection de 25 µL de décanal antérieure à la mesure. Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus dans l'étude réalisée par Ivask et al. (2002), la souche ici construite possède une sensibilité légèrement plus faible (8,5 μ M contre 1,5 μ M), un maximum de production de bioluminescence à une concentration différente (500 μ M contre 100 μ M) ainsi qu'une absence de détection pour la forme hexavalente du chrome. On peut penser qu'en plus de la construction bactérienne différente, les conditions expérimentales, notamment de milieu, sont responsables des différences de sensibilité et de détection. Cependant, malgré les différences entre ces souches, les réponses sont très proches.

Une fois la souche caractérisée en conditions fraiches, celle-ci a été lyophilisée puis a été de nouveau caractérisée.

2.1.1.2. En présence de bactéries lyophilisées

En conditions lyophilisées, la réponse du bioélément en présence de chrome est très faible. En effet, les valeurs de facteur d'induction n'atteignent pas 7 à la concentration de 500 μ M, contre 97,9 en condition fraiche. De plus, l'augmentation des durées d'incubation ne conduit pas à une augmentation de bioluminescence. Pour la suite des études, le temps de contact des souches lyophilisées en présence de métal a été défini à 30 minutes, durée identique à celle utilisée pour les bactéries fraiches ainsi que dans l'étude de lvask et al. (2002) (Figure 30).



Figure 30 : Influence des conditions physiologiques sur la production de bioluminescence par la bactérie *E. coli* pUCchrlux Les bactéries sont soit en conditions fraiches (bleu), soit en conditions lyophilisées. Pour cette dernière condition, les temps de contact sont soit de 30 minutes (rouge), 60 minutes (vert) ou 90 minutes (violet). Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 μL de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. 25 μL de décanal (30 μM) sont ajoutés avant la mesure. Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes.

Du fait de la faible réponse des souches en conditions lyophilisées, la suite des travaux porte sur l'optimisation des paramètres d'induction.

La lyophilisation est un processus qui entraine de nombreux effets secondaires, à savoir une déformation des membranes, ainsi qu'une perméabilité accrue pouvant conduire à la mortalité. De plus, les activités enzymatiques peuvent être diminuées après la réhydratation. En effet, comme montré dans l'étude portant sur la bactérie lactique *Lactobacillus reuteri*, selon la nature du cryoprotectant utilisé, on observe un taux de survie après lyophilisation qui varie entre 60 et 95%. L'activité des enzymes ATPases est elle aussi diminuée jusqu'à 40%, en comparaison à la condition bactérienne fraiche (Li et al. 2011). Cependant, il a été montré que la composition du milieu de lyophilisation pouvaient réduire ces effets délétères (Siaterlis et al. 2009; laconelli et al. 2015). Pour optimiser la production de bioluminescence des souches lyophilisées, les travaux ont alors porté sur l'étude de l'influence de la biomasse bactérienne et sur l'influence de la nature du cryoprotectant utilisé.

i. Influence de la biomasse bactérienne

Afin d'évaluer les effets du procédé de lyophilisation sur la mortalité bactérienne, les bactéries sont quantifiées par dénombrement des unités formant colonies. Avant la lyophilisation, 3,2.10⁷ bactéries/mL sont dénombrées. Après lyophilisation et revivification des bactéries, 6,3.10⁵ bactéries/mL sont présentes. La lyophilisation entraine alors une diminution de la biomasse bactérienne d'un facteur 50. Ainsi, on peut supposer que cette importante mortalité bactérienne peut expliquer la faible bioluminescence en conditions lyophilisées. Afin de tester cette hypothèse, une lyophilisation avec une biomasse plus importante a été réalisée. Les résultats sont visibles sur la Figure 31.





Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 μ L de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. 25 μ L de décanal (30 μ M) sont ajoutés avant la mesure. Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes.

Les résultats des souches lyophilisées, ajustées à une absorbance de $A_{620} = 0,075$ ou $A_{620} = 0,200$ conduisent aux mêmes effets, à savoir une bioluminescence aux valeurs proches et n'excédant pas 5 en FI. L'augmentation de la biomasse ne permet donc pas d'augmenter la production de bioluminescence, et *a fortiori*, ne permet pas d'atteindre les niveaux observés en présence de bactéries fraiches. Ainsi, la mortalité bactérienne n'est pas la cause de la très faible bioluminescence observée en conditions lyophilisées.

Dans la suite de l'étude, la nature et les effets du cryoprotectant ont été étudiés.

ii. Influence du cryoprotectant

Dans le cadre de cette étude, quatre molécules fréquemment utilisées en tant qu'agents cryoprotecteurs de microorganismes ont été testées. Il s'agit de trois oses (saccharose, raffinose, tréhalose) et d'un polyalcool (sorbitol) (Hubálek 2003).

Les résultats de bioluminescence en présence de ces différentes molécules sont présentés dans la Figure 32. En conditions lyophilisées, l'ensemble des conditions testées conduisent à des résultats proches : la bioluminescence bactérienne est faible et le FI ne dépasse pas la valeur de 5 au maximum de la réponse. Ainsi, en conditions lyophilisées, la nature du cryoprotectant n'a pas d'effet sur la production de bioluminescence (Figure 32A).

Les effets du cryoprotectant ont aussi été évalués sur les bactéries en conditions fraiches. Dans cette expérience, les bactéries sont induites dans un milieu contenant ou non du cryoprotectant (Figure 32B). Dans ces conditions, on observe une influence de la nature de la molécule sur la réponse. A la concentration de 250 μ M de chrome, les FI sont compris entre 6,7 et 33,1, avec des valeurs croissantes pour le sorbitol, le saccharose, le tréhalose et le raffinose. Cependant, ces valeurs sont bien inférieures à celles en absence de cryoprotectant (FI = 97,9). Ainsi, la seule présence du cryoprotectant est suffisante pour diminuer la production de bioluminescence. Cependant, l'ajout du cryoprotectant augmente la sensibilité de détection (Figure 32B, courbes bleue et rouge). En effet, la valeur maximale de production de bioluminescence est plus faible en présence de saccharose (250 μ M de chrome son absence). De plus, la bioluminescence est plus importante en présence de saccharose avec des faibles concentrations de chrome (pour 50 μ M de chrome, FI = 4,5 contre FI = 2,4 en son absence).

Ainsi, l'ajout du cryoprotectant, en plus du procédé de lyophilisation conduisent à l'absence de production de bioluminescence par la souche *E. coli* pUCchrlux. Ceci est non seulement valable en présence de saccharose (Figure 32C), mais aussi en présence des trois autres cryoprotectants utilisés. Cependant, du fait que ce phénomène ne soit pas dû à la diminution de la biomasse bactérienne, on peut alors supposer que l'activité des protéines de bioluminescence est diminuée, entrainant alors une production de bioluminescence plus faible. Cette hypothèse peut être vérifiée par la réalisation d'un dosage enzymatique réalisé avant et après le processus de lyophilisation (Li et al. 2011). Du fait que cette souche ne soit pas sensible à la présence de chrome en conditions lyophilisées, elle ne pourra pas être utilisée dans le cas d'une utilisation de terrain.



Figure 32 : Influence du cryoprotectant sur la production de bioluminescence par la bactérie *E. coli* pUCchrlux Le cryoprotectant utilisé est soit du saccharose à 24 % (\blacksquare), soit du raffinose à 10% (▲), soit du sorbitol à 20% (×), ou enfin, soit du tréhalose à la concentration de 100 mM (●). En absence de cryoprotectant, il s'agit du milieu acétate seul (♦). (A) Facteurs d'induction de bioluminescence en présence de la bactérie *E. coli* pUCchrlux sous forme lyophilisée. (B) Facteurs d'induction de bioluminescence en présence de la bactérie *E. coli* pUCchrlux sous forme fraiche, et contenant dans son milieu, la présence ou non d'un sucre protecteur. (C) Comparaison des conditions bactériennes fraiches et lyophilisées. Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 µL de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. 25 µL de décanal (30 µM) sont ajoutés avant la mesure. Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes. Suite à la caractérisation du bioélément détectant le chrome, les caractéristiques du bioélément détectant le plomb ont été étudiées.

2.1.2. Spécificités du bioélément E. coli pBpbrlux

Le bioélément détectant le plomb a été caractérisé dans un premier temps en conditions fraiches. Comme précédemment avec la souche détectrice de chrome et dans l'optique d'un bioessai utilisable hors des conditions de laboratoire, cette étude a ensuite été réalisée sur bactéries fraiches puis poursuivie en conditions lyophilisées. Seuls les résultats liés à cette deuxième condition vont être présentés (Figure 33).



Figure 33 : Influence de la durée d'incubation sur la détection du plomb par la bactérie *E. coli* pBpbrlux en condition lyophilisée

Trois durées d'incubation ont été étudiées : 60 minutes (bleu), 90 minutes (rouge) ou encore 120 minutes (vert). Bactérie sous forme lyophilisée. Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 µL de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. La durée d'incubation métal-bactéries est de 120 minutes .Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes.

Le bioélément *E. coli* pBpbrlux détecte le plomb de façon concentration dépendante. En effet, on observe une augmentation de la bioluminescence en présence de concentrations croissantes du métal. Après un maximum de production de bioluminescence en présence de 50 µM de plomb, celleci décroit, traduisant le fait que les concentrations deviennent toxiques pour la bactérie.

La durée d'incubation est importante pour la détection du plomb par cette souche. En effet, avec seulement 60 minutes de contact, la bioluminescence émise par la souche est très faible, le facteur d'induction correspondant n'excède pas la valeur de 3 au maximum. Compte tenu de l'écart type
(2,99 +/- 0,79), une incubation de 60 minutes n'est pas suffisante pour considérer que la réponse du bioélément soit fiable pour la détection du plomb. Avec l'augmentation de la durée du temps de contact, on constate que la production de bioluminescence augmente graduellement. A la concentration de 50 µM, le facteur d'induction initialement à 3,0 avec 60 minutes d'incubation, atteint 5,5 à 90 minutes et 7,5 à 120 minutes d'incubation. Ainsi, malgré le fait que cette souche ne produise que peu de bioluminescence, une incubation de 120 minutes est suffisante pour obtenir une gamme de valeurs de bioluminescence suffisant pour distinguer l'absence ou la présence de plomb.

Par la suite, les expériences impliquant le bioélément *E. coli* pBpbrlux se réaliseront avec un temps de contact métal/bactérie de 120 minutes. Il aurait été possible d'évaluer la réponse avec des durées d'incubation supérieures, mais ceci n'a pas été réalisé. En effet, bien qu'une augmentation de la durée puisse augmenter le facteur d'induction, dans l'optique de la conception d'un bioessai à réponse rapide, des durées d'incubation supérieures ne sont pas intéressantes.

Les spécificités de détection du bioélément ainsi que leurs sensibilités respectives ont ensuite été étudiées. La souche *E. coli* pBpbrlux détecte trois métaux, à savoir le plomb, le cadmium et le zinc, avec une production de bioluminescence qui est concentration dépendante (Figure 34).



Figure 34 : Caractérisation de la souche E. coli pBpbrlux en conditions lyophilisées

Les métaux qui sont détectés par la souche sont le plomb (bleu), le cadmium (rouge) et le zinc (vert). Bactérie sous forme lyophilisée. Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 µL de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. La durée d'incubation métal-bactéries est de 120 minutes. Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes. Ces spécificités de détections sont cohérentes avec celles reportées dans la littérature. En effet, de nombreux organismes possèdent ces mêmes spécificités de détection : c'est le cas notamment de la cyanobactérie *Anabaena* PCC 7120 (Liu et al. 2005), de la bactérie *E. coli* via son gène *zntA* (Binet and Poole 2000; Sharma et al. 2008) et de la bactérie *Staphylococcus aureus* via son gène *cadC* (Rensing et al. 1998).

Pour les trois métaux détectés, la faible expression de bioluminescence (FI < 10) s'explique par la présence d'autres systèmes de résistance au sein de la bactérie. En effet, en réponse à la présence de zinc par exemple, la bactérie active non seulement son gène *zntA* présent sur son génome, mais aussi le gène *pbrA* présent sur le plasmide. La meilleure efficacité du système d'efflux par la pompe ZntA par rapport à PbrA conduit alors à un plus faible taux d'efflux des ions métalliques par le système rapporteur, et *a fortiori*, à des taux de bioluminescence peu élevés (Hynninen et al. 2009).

Enfin, la limite de détection observée pour le plomb (3,85 μ M) est supérieure à la valeur de 0,1 μ M observée au cours de l'étude menée par Wei et al. (2014). Ce résultat peut s'expliquer par les différences de conditions expérimentales entre les deux études, c'est-à-dire par l'utilisation d'un milieu pauvre (milieu M9) et l'utilisation du gène rapporteur *gfp*. Par ces deux moyens, on observe des effets toxiques exacerbés et une synthèse de la protéine rapportrice facilitée, conduisant de ce fait à une meilleure sensibilité de ce bioélément. Cependant, il est à noter que malgré leurs différences, les deux souches présentent des sensibilités de détection proches.

2.1.3. Spécificités du bioélément E. coli pBgollux

Les caractéristiques du bioélément détectant l'or ont aussi été étudiées en conditions fraiches puis lyophilisées. Seule cette dernière condition sera décrite ici. La réponse du bioélément *E. coli* pBgollux en réponse à la présence d'or est concentration dépendante. La bioluminescence augmente jusqu'à atteindre un maximum à 50 µM d'or, puis décroit. De plus, l'augmentation des temps de contact entraine, comme précédemment observé avec le bioélément plomb, une augmentation de la production de bioluminescence. Ainsi, dans la suite des études, cette bactérie peut alors être utilisée comme bioélément fiable pour rapporter la présence de l'or, ceci suite à une incubation de 120 minutes (Figure 35A).

Concernant les spécificités de détection de la souche *E. coli* pBgollux, celle-ci détecte trois métaux, à savoir l'or, le cuivre et l'argent, ceci de manière dose dépendante (Figure 35B). Ces spécificités peuvent s'expliquer par le fait que ces trois composés appartiennent au groupe 11 (IB) du tableau

périodique des éléments. Une spécificité de réponse comparable a été observée en présence d'une construction possédant le promoteur PgolB en absence de la protéine senseur GolS. Ainsi, dans notre construction, il est possible que cette protéine ne permette pas la liaison spécifique des ions Or. Afin de vérifier cette hypothèse, il peut être intéressant de suivre l'expression de cette protéine par une expérience de Western-blot, ainsi que sa fonctionnalité par la liaison de cette dernière aux ions or à l'aide d'une chromatographie d'affinité. La présence d'un complexe GolS-Or nous indiquerait la fonctionnalité de la protéine (Raoufinia et al. 2016; Balkani et al. 2016).



Figure 35 : Caractérisation de la bactérie E. coli pBgollux en conditions lyophilisées

(A) Influence de la durée d'incubation : 60 minutes (bleu), 90 minutes (rouge) ou 120 minutes (vert). (B) Spécificité de la souche détectant l'or. Les métaux qui sont détectés par la souche sont l'or (vert), l'argent (turquoise) et le cuivre (orange). Bactérie sous forme lyophilisée. Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 μL de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. La durée d'incubation métal-bactéries est de 120 minutes .Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes.

Suite à la construction et à la caractérisation des trois souches détectrices, les réponses de ces dernières sont couplées aux quatre autres souches précédemment construites (Charrier et al. 2011).

2.2. Couplage des bioéléments détectant les métaux

2.2.1. Détection de l'or par le bioélément E. coli pBcoplux

Des études de spécificité ont été précédemment réalisées pour les quatre souches détectrices *E. coli* pBarslux, pBcoplux, pBmerlux et pBzntlux en présence d'un ensemble de 15 métaux. Afin de compléter le panel de spécificité de détection, l'or a aussi été testé. Parmi les quatre souches, il a été montré que seule la souche *E. coli* pBcoplux permet la détection de ce métal (Figure 36).



Figure 36 : Détection de l'or par la bactérie *E. coli* **pBcoplux en conditions lyophilisées** Bactérie sous forme lyophilisée. Après réhydratation des souches lyophilisées, les bactéries sont mises en contact avec 25 µL de métal puis incubées pendant 30 minutes à 30°C. La durée d'incubation métal-bactéries est de 60 minutes .Résultats issus de triplicats de trois expériences indépendantes.

2.2.2. Couplages des réponses entre bioéléments

Le nombre de métaux détectés par les quatre souches *E. coli* pBarslux, *E. coli* pBcoplux, *E. coli* pBmerlux et *E. coli* pBzntlux sont respectivement de 4, 3, 6 et 12. Avec l'augmentation du nombre de souches détectrices à sept, trois métaux supplémentaires peuvent être distingués : le plomb, le zinc, ainsi que le chrome (Figure 37). L'ensemble des spécificités et sensibilités de détections sont regroupés dans le tableau récapitulatif suivant (Tableau 24).



Figure 37 : Représentation des spécificités des souches bioluminescentes inductibles Les traits plein correspondent aux souches construites antérieurement par Charrier et al. (2011), tandis que les pointillés correspondent aux souches construites au cours de ces travaux.

| Souche | E. coli | E. coli | E. coli | E. coli | E. coli | E. coli | E. coli |
|---------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| bactérienne | pBarslux | pBcoplux | pBmerlux | pBzntlux | pBpbrlux | pBgollux | pUCchrlux |
| Métal | | | Lyopl | hilisé | | | Fraiche |
| Argent | Nd | 2,75 (4,0%) | Nd | Nd | Nd | 1,07 (14,3%) | Nd |
| Arsenic (III) | 0,256 (0,5%) | Nd | 15,6 (27,6%) | 28,52 (24,9%) | Nd | Nd | Nd |
| Arsenic (V) | 0,3 (20,0%) | Nd | 12,65 (42,7%) | 9,32 (13,3%) | Nd | Nd | Nd |
| Cadmium | 5,9 (39,0%) | Nd | 0,011 (18,2%) | 0,00045 (6,7%) | 0,125 (3,3%) | Nd | Nd |
| Chrome (III) | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | 8,46 (24,9%) |
| Chrome (VI) | Nd | Nd | Nd | 597,2 (20,3%) | Nd | Nd | Nd |
| Cobalt | Nd | Nd | Nd | 0,022 (6,4%) | Nd | Nd | Nd |
| Cuivre | Nd | 90,5 (12,9%) | Nd | 16,92 (17,1%) | Nd | 150,02 (26,2%) | Nd |
| Etain | Nd | Nd | Nd | 12,95 (32,7%) | Nd | Nd | Nd |
| Fer | Nd | Nd | 16,1 (47,2%) | 4,34 (11,1%) | Nd | Nd | Nd |
| Manganèse | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd |
| Mercure | Nd | Nd | 1,7 ^E -07 (58,8%) | 0,001 (50,0%) | Nd | Nd | Nd |
| Nickel | Nd | Nd | Nd | 4,4 (36,4%) | Nd | Nd | Nd |
| Or | Nd | 22,14 (3,3%) | Nd | Nd | Nd | 1,83 (9,6%) | Nd |
| Plomb | 4,16 (19,2%) | Nd | Nd | 2,2 (27,3%) | 3,85 (29,7%) | Nd | Nd |
| Zinc | Nd | Nd | 2,3 (6,1%) | 1,7 (36,5%) | 7,0 (27,2%) | Nd | Nd |

Tableau 24 : Métaux et limites de détection des souches bactériennes inductibles

Les concentrations sont en µM, et l'écart type est entre parenthèses, sous forme de pourcentage. Nd : Non détecté En bleu apparaissent les résultats obtenus lors de travaux antérieurs (Jouanneau et al. 2011). Le plomb est reconnu par les bioéléments *E. coli* pBzntlux, *E. coli* pBarslux et *E. coli* pBpbrlux. Ces trois souches possèdent des limites de détection de l'ordre du micromolaire de plomb. De même, le zinc est reconnu par les bioéléments *E. coli* pBzntlux, *E. coli* pBmerlux pour lesquelles les limites de détection sont d'environ 0,5 μ M et par la souche *E. coli* pBpbrlux qui possède une limite de détection de 7 μ M de zinc. Les détections du plomb et du zinc étant sensibles, ces bioéléments peuvent être utilisés pour la détection de ces métaux dans le cas de faibles contaminations.

Cependant, la quantification des deux métaux plomb et zinc par arbres de décision est difficile. En effet, c'est sur la base de la réponse de la souche *E. coli* pBpbrlux que sont distingués ces deux métaux (Figure 37). Or, cette même souche possède une gamme de production de bioluminescence limitée, discriminant difficilement une faible d'une forte concentration en métal. Ainsi, le couplage des souches permet une analyse qualitative via la détection de ces métaux, sans pour autant permettre leur quantification. Pour se faire, une étape préliminaire d'augmentation de la production de bioluminescence par la souche *E. coli* pBpbrlux est nécessaire, avant son intégration dans une analyse quantitative par arbre de décision. Pour cela, il est envisagé une transformation du plasmide pBpbrlux au sein d'une souche invalidée pour son gène *zntA*. Par ce biais, on peut s'attendre à obtenir une augmentation de la prise en charge des ions métalliques par le système rapporteur, conduisant de ce fait à une production de bioluminescence plus importante et significativement différente selon le niveau de contamination.

Les deux souches *E. coli* pBgollux et *E. coli* pBcoplux détectent les trois métaux or, argent et cuivre, comme montré dans la littérature (Stoyanov and Brown 2003). Ceci s'explique par le fait que, en plus de posséder des gènes de transport d'ions aux fonctions redondantes (Osman et al. 2010), les protéines régulatrices GoIS et CueR respectivement sont identiques dans leur séquence d'acides aminés à hauteur de 42 % (Checa and Soncini 2010). Cependant, des différences dans la région C-terminale de leurs protéines régulatrices conduisent à leur classement en deux groupes phylogénétiques distincts. La séquence C-terminale de la protéine régulatrice GoIS est décrite comme possédant une affinité pour l'or supérieure au cuivre et inversement, la séquence C-terminale de la protéine CueR possède une affinité supérieure pour le cuivre en comparaison à l'or (Checa et al. 2007). Ceci entraine des différences dans les limites de détection de ces métaux : la détection de l'or est près de 12 fois plus sensible par la souche *E. coli* pBgollux et de même, la détection du cuivre est près de 2 fois plus sensible par la souche *E. coli* pBcoplux. De ce fait, l'utilisation couplée de ces souches permettra d'apporter une cross-validation des réponses, en plus de pouvoir affiner la quantification des métaux détectés.

Pour l'ensemble des bioéléments, la souche porteuse des gènes de résistance et la souche hôte sont différentes. Les gènes d'intérêt sont portés soit par la bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 (chrome et plomb), soit par la bactérie *Salmonella typhimurium* (or), mais ont tous été clonés au sein de la même bactérie hôte *E. coli*. La principale limitation dans l'expression hétérologue est due à la fréquence d'usage des codons entre la bactérie d'origine et la bactérie hôte. Alors qu'ils peuvent être utilisés couramment au sein de la première, ces mêmes codons peuvent être utilisés moins fréquemment dans la seconde. Ces codons rares peuvent alors être inefficacement incorporés dans l'organisme hôte, entrainant alors une production diminuée de protéines fonctionnelles (Terpe 2006; Ferrer-Miralles et al. 2009). Dans le cas des séquences codant pour les protéines PbrR et GolB, on note la présence respectivement de 9% et de 13% de codons rares chez *E. coli*. Ceci peut alors expliquer les différences observées des temps de réponse des différents bioéléments : alors que le temps de réponse n'est que d'une heure dans le cas d'une expression homologue (souche *E. coli* pBzntlux par exemple), cette durée est au moins doublée dans le cas contraire.

Les effets de la lyophilisation précédemment mis en évidence sur le bioélément détectant le chrome sont aussi valables sur les deux bioéléments rapportant la présence de plomb et d'or. En effet, en comparaison à la condition bactérienne fraiche, la lyophilisation des souches E. coli pBpbrlux et E. coli pBgollux entraine une production de bioluminescence plus faible ainsi qu'une meilleure sensibilité de détection. Il en est de même pour toutes les autres souches construites antérieurement à ces travaux, à savoir les bioéléments E. coli pBarslux, E. coli pBcoplux, E. coli pBmerlux et E. coli pBzntlux (Jouanneau et al. 2011). Cependant, la diminution de bioluminescence due au procédé de lyophilisation est encore plus importante dans le cas de la souche détectrice de chrome. Ceci peut s'expliquer par le fait que, contrairement aux autres souches détectrices qui possèdent les enzymes de synthèse de l'aldéhyde (*luxCDE*), la souche chrome ne les possède pas et nécessite son ajout sous forme de décanal (aldéhyde substrat de la réaction) antérieurement à la mesure. Couplé à une perméabilité accrue de la membrane bactérienne, ces deux phénomènes peuvent expliquer la très faible réponse bactérienne du bioélément E. coli pUCchrlux en conditions lyophilisées (Sinskey and Silverman 1970; Israeli et al. 1974). Pour valider cette hypothèse, il peut être intéressant de construire la souche chrome sur la même base génétique que les autres souches détectrices, c'est-àdire avec l'ensemble de l'opéron de bioluminescence luxCDABE.

2.2.3. Conclusions sur les bioéléments construits

Trois bioéléments dédiés à la détection du chrome, du plomb et de l'or ont été construits puis caractérisés. Dans le cas de la souche détectrice de chrome, il s'avère que malgré une spécificité de

détection restreinte au Cr(III) ainsi qu'une limite de détection assez faible en conditions fraiches, ce bioélément ne détecte plus ce métal en conditions lyophilisées. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de remédier à cette limitation et de permettre son intégration dans le système analytique puis son application dans des études de terrain.

Les deux souches détectrices de plomb et d'or possèdent quant à elles de bonnes sensibilités de détection en conditions lyophilisées. Cependant, dans le cas de la souche plomb, des niveaux de bioluminescence insuffisants ne nous permettent pas de réaliser une étude semi-quantitative des métaux plomb et zinc. Des travaux supplémentaires visant à augmenter la production de bioluminescence de cette souche seront nécessaires avant de l'intégrer au sein d'analyses semiquantitatives par arbres de décision. Enfin, les deux souches dédiées à la détection de cuivre (*E. coli* pBcoplux) et d'or (*E. coli* pBgollux) possèdent strictement les mêmes spécificités, mais avec des sensibilités différentes. De ce fait, en plus de permettre une validation croisée des réponses, l'utilisation couplée de ces deux souches pourra apporter des précisions sur le niveau de contamination de l'échantillon vis-à-vis des trois métaux cuivre, argent et or.

Suite à la caractérisation des réponses des souches détectrices, celles-ci vont être utilisées pour caractériser les échantillons environnementaux.

2.3. Caractérisation de la contamination métallique contenue dans des échantillons environnementaux

Au cours de cette partie, les échantillons vont être caractérisés du point de vue de leurs contaminations métalliques. Pour cela, ils seront chacun analysés à la fois à l'aide de méthodes chimiques et à la fois à l'aide des bioéléments bactériens. Les bioéléments bactériens utilisés sont de deux natures : *(i)* l'utilisation de la souche constitutive *E. coli* pBtaclux permet d'évaluer le niveau de toxicité globale de l'échantillon, tandis que *(ii)* les six souches inductibles détectrices de métaux permettront la semi-quantification des métaux par arbres de décision (cas de l'arsenic, cuivre, mercure et cadmium), ou à défaut, l'apport d'une information qualitative par rapport à leur présence ou à leur absence (cas du plomb et du zinc).

Dans les paragraphes suivants et notamment dans les tableaux relatifs à la quantification des métaux, la mention Nq (Non quantifié) apparait pour le zinc et le plomb du fait que les arbres de décision pour ces métaux n'aient pas été établis. De plus, les niveaux de bioluminescence des deux

souches *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux apparaissent afin d'apporter une analyse qualitative vis-àvis des métaux présents. Les résultats sont notés en FI.

Les échantillons étudiés, présentés dans le chapitre Matériel et méthodes, paragraphe 5, seront analysés ceci suivant une complexité croissante : débutant avec des échantillons de laboratoire artificiellement contaminés (E et R), puis des effluents d'industrie chimique (Sol), des échantillons solides tels que le Bois (B) et la Terre (T) seront ensuite analysés. Suite à la caractérisation tour à tour des échantillons, l'ensemble de leurs caractéristiques sera résumé dans la partie 2.3.8 de ce chapitre.

2.3.1. Échantillon E-Mélange

L'échantillon E-mélange est un échantillon de laboratoire réalisé en eau distillée, contenant les six métaux arsenic, cuivre, mercure, cadmium zinc et plomb. La toxicité globale ainsi que la quantification des métaux mobilisables et biodisponibles pour cet échantillon sont présentés dans la Figure 38 et le Tableau 25 respectivement.



Figure 38 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence de l'échantillon E-Mélange

| | E-Me | élange |
|-------------------------|----------|---------------|
| | Chimique | Biologique |
| Arsenic | 12,5 | [25 ; 250[|
| Cuivre | 125 | [0 ; 250[|
| Mercure | 0,12 | [0,25 ; 250[|
| Cadmium | 1,2 | [12,5 ; 2500[|
| Zinc | 12,5 | Nq |
| Plomb | 12,5 | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | Nd |

Tableau 25 : Quantification des métaux présents au sein de l'échantillon E-Mélange

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en µM de métal. Chimique correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biologique correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles. En gras sont affichés les métaux pour lesquels les résultats entre les deux types d'analyses ne sont pas concordants.

L'échantillon E-Mélange présente une inhibition de bioluminescence d'environ 55%, ceci malgré sa dilution au 1/50. Il est alors très toxique pour la bactérie.

Pour les trois métaux arsenic, mercure et cadmium, on observe une concentration estimée par les bioéléments bactériens supérieure à celle réellement contenue dans le mélange. De ce fait, on peut alors supposer l'existence de relations synergiques entre ces métaux, pouvant justifier la forte toxicité de l'échantillon. Cependant, présent dans le mélange à une concentration de 125 μ M, la concentration estimée de cuivre par bioélément est comprise entre 0 et 250 μ M. De plus, l'absence de bioluminescence de la bactérie *E. coli* pBgollux, détectant le cuivre à partir de 150 μ M, nous laisse supposer que celui-ci est présent en concentration inférieure. La concentration biodisponible de cuivre dans le mélange est alors estimée entre 0 et 150 μ M. Des relations d'antagonisme entre le cuivre et les autres métaux sont alors visibles. Enfin, malgré la présence des trois métaux cadmium (1,2 μ M), zinc (12,5 μ M) et plomb (12,5 μ M) au-delà des limites de détection de la souche *E. coli* pBpbrlux (0,125 μ M, 7,0 μ M et 3,85 μ M respectivement), cette dernière ne produit pas de bioluminescence. En d'autres termes, ces trois métaux ne sont pas biodisponibles et/ou, comme dans le cas du cuivre, des relations d'antagonisme entre ces différents métaux sont visibles.

2.3.2. Échantillons contenus en eau de rivière (R)

Les échantillons Rivière sont constitués d'eau de rivière artificiellement contaminée par du cuivre, du cadmium, ou un mélange des deux métaux. Les résultats de toxicité globale, ainsi que la quantification des métaux sont présentés sur la Figure 39 et dans le Tableau 26 respectivement.



Figure 39 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie *E. coli* pBtaclux en présence des échantillons contenus en eau de rivière

| | R- | Témoin | R-C2-Cop | | R | -C2-Cad | R- | Cop-Cad | R-Cad-Cop | |
|-------------------------|-------|--------------|----------|--------------|-------|---------------|-------|---------------|-----------|---------------|
| | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. |
| Arsenic | Nd | [0 ; 0,5[| 0 | [0 ; 0,5[| 0 | [0 ; 25[| 0 | [0 ; 25[| 0 | [0 ; 25[|
| Cuivre | Nd | [0 ; 5[| 950 | [50 ; 5000[| 0 | [0 ; 250[| 950 | [0 ; 250[| 303 | [0 ; 250[|
| Mercure | Nd | [0 ; 0,0005[| 0 | [0 ; 0,0005[| 0 | [0 ; 0,025[| 0 | [0,25 ; 250[| 0 | [0,25 ; 250[|
| Cadmium | Nd | [0 ; 0,025[| 0 | [0 ; 0,025[| 530 | [12,5 ; 2500[| 800 | [12,5 ; 2500[| 132,5 | [12,5 ; 2500[|
| Zinc | Nd | Nq | 0 | Nq | 0 | Nq | 0 | Nq | 0 | Nq |
| Plomb | Nd | Nq | 0 | Nq | 0 | Nq | 0 | Nq | 0 | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | Nd | | 34,55 | | Nd | | 3,46 | | 8,67 |

Tableau 26 : Quantification des métaux présents dans les échantillons contenus en eau de rivière

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en µM de métal. Chimique correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biologique correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles. En gras sont affichés les métaux pour lesquels les résultats entre les deux types d'analyses ne sont pas concordants.

L'échantillon R-Témoin présente un taux d'inhibition de bioluminescence de -15%, il n'est donc pas toxique. De plus, aucun métal n'a été dosé chimiquement ou encore détecté par les bactéries. Il correspond donc bien à un témoin ne possédant pas de métaux. L'échantillon R-C2-Cop présente un taux d'inhibition de bioluminescence de 52% environ en condition non diluée, il est alors considéré comme moyennement toxique. De même, l'échantillon R-C2-Cad présente un taux d'inhibition de

bioluminescence de 44% environ avec une dilution au 1/50, il est alors considéré comme fortement toxique. Pour les deux échantillons R-C2-Cop et R-C2-Cad, les concentrations mobilisables et biodisponibles des métaux sont concordantes, le cuivre et le cadmium sont effectivement quantifiés à hauteur de leur concentration réelle dans les échantillons.

Les deux mélanges R-Cop-Cad et R-Cad-Cop sont tous les deux très toxiques et conduisent à une inhibition de bioluminescence de 70% et 41% respectivement avec une dilution au 1/50. Alors que la concentration de cadmium est cohérente entre le dosage chimique et l'estimation par les bioéléments bactériens, ceci n'est pas valable pour le cuivre, pour lequel la concetration biodisponible est sous-estimée. Que la concentration initiale soit de 303 µM (échantillon R-Cad-Cop) ou de 950 µM (échantillon R-Cop-Cad), les souches détectrices évaluent la concentration de cuivre comme étant comprise entre 0 et 250 µM. De plus, du fait que le bioélément E. coli pBgollux émette de la bioluminescence, la concentration biodisponible de cuivre est supérieure à la limite de détection de 150 μ M, conduisant alors à une estimation de la concentration de celui-ci entre 150 et 250 µM. Enfin, les bioéléments bactériens détectent du mercure en concentration comprise entre 0,25 et 250 µM, alors qu'il n'est pas dosé au sein de l'échantillon. Ainsi, pour les échantillons en mélange dans l'eau de rivière, on observe d'une part une sous-estimation de la quantification du cuivre et d'autre part, la détection de mercure à des concentrations non négligeables. On peut alors supposer qu'il existe des relations d'interaction entre les composés de la rivière et ces deux métaux, lesquelles pourraient chélater le cuivre par exemple et conduire à son absence de détection. Au contraire, il doit exister des relations de synergisme avec le mercure ou bien la présence d'analogues de cette molécule, lesquels pouvant réagir avec les bactéries détectrices. En effet, les spécificités des bactéries détectrices de métal étant multiples, une détection croisée n'est pas impossible.

2.3.3. Lixiviat de l'échantillon de Boue (Ref-Boue)

Le lixiviat de l'échantillon de Boue a été évalué pour sa toxicité globale (Figure 40) ainsi que pour sa teneur en métaux mobilisables et biodisponibles (Tableau 27).



Figure 40 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence du lixiviat de l'échantillon de boue

| | Ref- | Boue |
|-------------------------|----------|--------------|
| | Chimique | Biologique |
| Arsenic | Nd | [0 ; 2,5[|
| Cuivre | 5 309 | [25 ; 250[|
| Mercure | Nd | [0 ; 0,0025[|
| Cadmium | Nd | [0 ; 0,125[|
| Zinc | 0,198 | Nq |
| Plomb | 171,3 | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | 36,32 |

Tableau 27 : Quantification des métaux présents dans le lixiviat de l'échantillon de boue

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en µM de métal. Chimique correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biologique correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles. En gras sont affichés les métaux pour lesquels les résultats entre les deux types d'analyses ne sont pas concordants.

L'échantillon Ref-Boue présente une inhibition de bioluminescence de l'ordre de 35% en présence d'une dilution au 1/5, il est alors moyennement toxique pour la bactérie. Cet échantillon contient de fortes concentrations de plomb et de cuivre. Cependant, malgré le fait que le plomb ait été dosé à 171,3 μ M dans l'échantillon, celui-ci n'est pas détecté par la bactérie *E. coli* pBpbrlux, laquelle présente une limite de détection pour celui-ci de 3,85 μ M. Ainsi, le plomb ne semble pas biodisponible. Au contraire, le cuivre est détecté par les bactéries bioluminescentes *E. coli* pBgollux et *E. coli* pBcoplux. Alors qu'il est dosé à plus de 5 mM par analyse chimique, sa concentration biodisponible n'est estimée qu'entre 150 et 250 μ M. Ainsi, malgré d'importantes contaminations initiales, les métaux ont été peu extraits lors de la lixiviation et/ou sont peu biodisponibles.

2.3.4. Lixiviats des échantillons de sédiment (Ref-Sed)

Les échantillons de sédiment sont des échantillons certifiés. Après lixiviation, les deux échantillons de sédiment ne présentent pas la même valeur de pH, laquelle est légèrement basique pour l'échantillon Ref-Sed1 (pH = 8) et acide pour l'échantillon Ref-Sed2 (pH = 4,6). Les lixiviats des échantillons de sédiment ont été évalués pour leur toxicité globale (Figure 41), ainsi que pour leurs teneurs en métaux mobilisables et biodisponibles (Tableau 28).



Figure 41 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie *E. coli* pBtaclux en présence des lixiviats des échantillons de sédiment

| Tableau 28 | : Ouantification | des métaux | présents | dans le | s lixiviats d | les échantillons | de sédiment |
|------------|------------------|------------|----------|----------|---------------|------------------|-------------|
| | . Quantineation | aco metuax | presents | auns ic. | | | ac scannent |

| | Ref- | Sed1 | Ref- | Sed2 |
|-------------------------|----------|--------------|----------|--------------|
| | Chimique | Biologique | Chimique | Biologique |
| Arsenic | 0,409 | [0 ; 0,5[| 0,084 | [0 ; 0,5[|
| Cuivre | 0,676 | [0 ; 5[| 0,291 | [0 ; 5[|
| Mercure | Nd | [0 ; 0,0005[| 0,008 | [0 ; 0,0005[|
| Cadmium | Nd | [0 ; 0,025[| Nd | [0 ; 0,025[|
| Zinc | 0,191 | Nq | 0,386 | Nq |
| Plomb | Nd | Nq | 0,119 | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | Nd | | Nd |

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en µM de métal. Chimique correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biologique correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles. En gras sont affichés les métaux pour lesquels les résultats entre les deux types d'analyses ne sont pas concordants.

Les deux échantillons présentent des toxicités proches, avec une inhibition de bioluminescence de l'ordre de 35%. Ils sont donc considérés comme étant moyennement toxiques. Le dosage chimique nous indique qu'ils présentent de faibles contaminations en métaux, lesquelles sont concordantes

avec les estimations à l'aide des bioéléments bactériens. Seule la concentration du mercure pour l'échantillon Ref-Sed2 est sous-estimée, ceci pouvant être la résultante d'une faible disponibilité de ce métal.

2.3.5. Échantillons industriels Solvay (Sol)

Les échantillons Solvay sont des effluents de sortie de procédé de fabrication de polymères chimiques. Leur toxicité globale ainsi que la teneur en métaux mobilisables et biodisponibles sont présentés dans la Figure 42 et le Tableau 29 respectivement.



Figure 42 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des échantillons industriels Solvay

| | S | ol-DCE | So | ol-N008 | So | l-BoueB | So | ol-N809 |
|-------------------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
| | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. |
| Arsenic | 0,172 | [0 ; 0,5[| Nd | [0 ; 0,5[| Nd | [0 ; 0,5[| Nd | [0 ; 0,5[|
| Cuivre | 10,24 | [0 ; 5[| 3,273 | [0;5[| 0,541 | [0;5[| 0,316 | [0 ; 5[|
| Mercure | 0,002 | [0 ; 0,0005[| Nd | [0 ; 0,0005[| 0,001 | [0 ; 0,0005[| Nd | [0 ; 0,0005[|
| Cadmium | Nd | [0 ; 0,025[|
| Zinc | 0,422 | Nq | 0,145 | Nq | 0,201 | Nq | Nd | Nq |
| Plomb | Nd | Nq | 0,024 | Nq | 0,238 | Nq | Nd | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd |

Tableau 29 : Quantification des métaux présents au sein des échantillons industriels Solvay

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en μ M de métal. Chim. correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biol. correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles. En gras sont affichés les métaux pour lesquels les résultats entre les deux types d'analyses ne sont pas concordants.

Les échantillons Solvay présentent une toxicité différente selon les échantillons : l'échantillon Sol-DCE est toxique et présente une inhibition de bioluminescence de la bactérie *E. coli* pBtaclux de près de 85% avec une dilution au 1/10. Les deux échantillons Sol-N008 et Sol-BoueB sont peu toxiques et conduisent à une diminution de bioluminescence de l'ordre de 30% en condition pure. Enfin, l'échantillon Sol-N809 est très peu voire pas toxique et présente un taux d'inhibition de bioluminescence de seulement 6% en condition pure.

L'échantillon Sol-DCE contient de l'arsenic, du cuivre et du mercure. Cependant, ces mêmes métaux ne sont pas détectés par les bioéléments bactériens. Ainsi, la forte toxicité de cet échantillon ne se justifie pas par la présence de métaux, mais peut être due à la présence de molécules organiques utilisées au cours de la fabrication des produits. De même, les trois autres échantillons Sol-N008, Sol-BoueB et Sol-N809 ne contiennent que peu de métaux, dont la quantification est confirmée par la réponse des bactéries détectrices. Seule une exception est visible pour l'échantillon Sol-BoueB, pour lequel la concentration biodisponible estimée de mercure est inférieure à la concentration mobilisable. De manière globale, du fait de l'absence de détection des métaux par les bactéries bioluminescentes, les métaux présents ne sont pas biodisponibles. On peut supposer que ceux-ci ont été chélatés par d'autres composés présents dans l'échantillon.

Enfin, on observe une évolution du profil selon l'avancement des effluents dans le processus de décontamination : initialement toxique et chargé en métaux, cet effluent devient peu toxique et faiblement contaminé. Ainsi, nous pouvons affirmer qu'à chacune des étapes du procédé, il y a modification de la composition de l'effluent, sans pour autant rendre biodisponibles les métaux présents.

2.3.6. Lixiviats des échantillons de Terre (T)

Les échantillons de Terre sont issus d'une étude comparative de traitement de dépollution des sols. Deux procédés sont testés (Indoor et Neobab), ceci selon deux points de prélèvement au cours du temps. Les lixiviats des échantillons de Terre ont été évalués pour leur toxicité (Figure 43), ainsi que pour leurs teneurs en métaux mobilisables et biodisponibles (Tableau 30).



Figure 43 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des lixiviats des échantillons de terre

| | т-т | émoin1 | T-I | Indoor1 | T-N | leobab1 | T-1 | Témoin2 | T-Indoor2 | | T-Neobab2 | |
|-------------------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. |
| Arsenic | 0,265 | [0 ; 0,5[| 0,293 | [0 ; 0,5[| 0,244 | [0 ; 0,5[| 0,265 | [0 ; 0,5[| 0,272 | [0 ; 0,5[| 0,197 | [0 ; 0,5[|
| Cuivre | 3,682 | [0 ; 5[| 3,619 | [0;5[| 3,949 | [0 ; 5[| 3,855 | [0 ; 5[| 3,005 | [0 ; 5[| 3,902 | [0;5[|
| Mercure | 0,009 | [0 ; 0,0005[| 0,009 | [0 ; 0,0005[| 0,008 | [0 ; 0,0005[| 0,026 | [0 ; 0,0005[| 0,013 | [0 ; 0,0005[| 0,001 | [0 ; 0,0005[|
| Cadmium | Nd | [0 ; 0,025[| Nd | [0 ; 0,025[| Nd | [0 ; 0,025[|
| Zinc | 7,494 | Nq | 8,412 | Nq | 6,944 | Nq | 11,31 | Nq | 7,051 | Nq | 9,238 | Nq |
| Plomb | 0,892 | Nq | 1,225 | Nq | 0,772 | Nq | 0,936 | Nq | 0,984 | Nq | 0,926 | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd |

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en μ M de métal. Chim. correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biol. correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles. En gras sont affichés les métaux pour lesquels les résultats entre les deux types d'analyses ne sont pas concordants.

Les échantillons présents dans la matrice terre présentent une inhibition de bioluminescence comprise entre 11 et 20 % en condition pure. Ces échantillons sont alors très peu toxiques. Pour les trois métaux arsenic, cuivre et cadmium, la quantification de leurs concentrations par les analyses chimiques ou par les bioéléments bactériens sont concordantes. Cependant, pour l'ensemble des échantillons, la concentration biodisponible de mercure est inférieure à celle réellement présente dans l'échantillon. On peut alors supposer que ce métal n'est que peu biodisponible lorsqu'il est présent dans la terre. De plus, la détection des métaux à l'aide des bioéléments bactériens n'a conduit à aucune production de bioluminescence pour les 6 souches bactériennes, pour l'ensemble des échantillons testés. Malgré les fortes concentrations de zinc, la souche *E. coli* pBpbrlux ne le

détecte pas (limite de détection de 3,85 μ M). Ainsi, de même que pour le mercure, il est possible que le zinc ne soit pas biodisponible ou bien que des relations antagonistes soient visibles.

Enfin, ni le processus de dépollution (Indoor ou Neobab), ni la durée de l'expérimentation (1 mois) n'ont conduit à des modifications dans les caractéristiques des sols (pH et concentration des métaux).

2.3.7. Lixiviats des échantillons de Bois (B)

Les échantillons de bois sont de deux natures : les deux échantillons B-020 et B-051 sont des échantillons artificiellement contaminés au laboratoire, alors que les quatre autres échantillons sont des échantillons environnementaux aux caractéristiques inconnues. Les lixiviats des échantillons de bois ont été évalués pour leur toxicité globale (Figure 44), ainsi que pour leurs teneurs en métaux mobilisables et biodisponibles (Tableau 31).



Figure 44 : Inhibition de bioluminescence de la bactérie E. coli pBtaclux en présence des lixiviats des échantillons de bois

| | B-020 | | B-051 | | | B-BR1 | | B-BC2 | | B-BC4 | B-CCA2 | |
|-------------------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|--------------|-------|--------------|--------|---------------|
| | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. | Chim. | Biol. |
| Arsenic | Nq | [0 ; 0,5[| Nq | [0 ; 0,5[| Nq | [0 ; 0,5[| Nq | [0 ; 0,5[| Nq | [0 ; 0,5[| Nq | [2,5 ; 25[|
| Cuivre | Nq | [0 ; 5[| Nq | [0 ; 5[| Nq | [0;5[| Nq | [0;5[| Nq | [0 ; 5[| Nq | [25 ; 250[|
| Mercure | Nq | [0 ; 0,0005[| Nq | [0;0,0005[| Nq | [0;0,0005[| Nq | [0 ; 0,0005[| Nq | [0 ; 0,0005[| Nq | [0 ; 0,0025[|
| Cadmium | Nq | [0 ; 0,025[| Nq | [0 ; 0,025[| Nq | [0 ; 0,025[| Nq | [0 ; 0,025[| Nq | [0 ; 0,025[| Nq | [1,25 ; 2500[|
| Zinc | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq |
| Plomb | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq | Nq |
| <i>E. coli</i> pBpbrlux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd |
| <i>E. coli</i> pBgollux | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | Nd | | 8,53 |

Tableau 31 : Quantification des métaux présents au sein des lixiviats des échantillons de bois

Nd : Non détecté par les bioéléments bactériens. Nq : Non quantifié par analyse chimique ou par arbre de décision. *E. coli* pBpbrlux et *E. coli* pBgollux font référence aux niveaux de bioluminescence de ces deux souches. Concentrations en μM de métal. Chim. correspond aux résultats du dosage chimique par ICP-MS et Biol. correspond aux concentrations déterminées par les arbres de décision sur la base des réponses des souches bioluminescentes inductibles.

Les lixiviats des échantillons de bois se distinguent par leur pH. Légèrement basique pour les échantillons de laboratoire (proche de 8), il est au contraire acide pour les échantillons environnementaux (pH compris entre 4,2 et 4,8). De plus, ces deux types d'échantillons présentent des toxicités différentes. Les deux échantillons de laboratoire sont faiblement toxiques et présentent une inhibition de bioluminescence de la bactérie constitutive *E. coli* pBtaclux d'environ 35%. Les échantillons environnementaux quant à eux sont toxiques et présentent des valeurs d'inhibition de bioluminescence comprises entre 65 et 100 % pour la condition pure.

Le dosage chimique des métaux présents dans ces échantillons n'a pas pu être réalisé en raison du faible volume d'échantillon disponible. Ils ont cependant été évalués pour leurs concentrations en métaux biodisponibles par les bioéléments bactériens. Grâce aux réponses des bactéries bioluminescentes détectrices, il a été montré que seul l'échantillon B-CCA2 contient des métaux biodisponibles, c'est à dire arsenic, cadmium et cuivre. De plus, la présence de ce dernier est aussi confirmée par la réponse de la souche *E. coli* pBgollux qui rapporte la présence de cuivre à partir de 150 µM. Cependant, du fait que les analyses chimiques n'aient pas été réalisées, il est impossible de caractériser les relations d'interactions entre les métaux.

2.3.8. Résumé des caractéristiques de l'ensemble des échantillons

Afin d'avoir une vue d'ensemble des caractéristiques de l'ensemble des échantillons, les informations sont résumées dans le Tableau 32.

| Echantillon | Toxicité | Présence ou absence de | D | étecti | on de bioélé | métau ément | ıx par l s | es | Relations entre métaux | | |
|---------------------------------|----------|---------------------------|---------------|---------|-----------------|----------------|---------------|----|---------------------------|--|--|
| | Bionaic | métaux | As | Cu | Hg | Cd | Pb | Zn | metaux | | |
| | | N | / étau | x en e | au dis | tillée | | | Ι | | |
| E-Mélange | | Présence | Х | | Х | Х | | | Synergique, antagoniste | | |
| | | N | létaux | en ea | u de r | ivière | | | 1 | | |
| R-Témoin | | Absence | | | | | | | | | |
| R-C2-Cop | | Présence | | Х | | | | | | | |
| R-C2-Cad | | Présence | | | | Х | | | | | |
| R-Cop-Cad | | Présence | | | Х | Х | | | Antagoniste | | |
| R-Cad-Cop | | Présence | | | Х | Х | | | Antagoniste | | |
| Echantillons de référence | | | | | | | | | | | |
| Ref-Boue | | Présence | | Х | | | | | | | |
| Ref-Sed1 | | Absence | | | | | | | | | |
| Ref-Sed2 | | Absence | | | | | | | | | |
| Echantillons industriels Solvay | | | | | | | | | | | |
| Sol-DCE | | Absence | | | | | | | | | |
| Sol-N008 | | Absence | | | | | | | | | |
| Sol-BoueB | | Absence | | | | | | | | | |
| Sol-N809 | | Absence | | | | | | | | | |
| | | | Echan | tillons | s de Te | erre | | | | | |
| T-Témoin1 | | Absence | | | | | | | | | |
| T-Indoor1 | | Absence | | | | | | | | | |
| T-Neobab1 | | Absence | | | | | | | | | |
| T-Témoin2 | | Absence | | | | | | | | | |
| T-Indoor2 | | Absence | | | | | | | | | |
| T-Neobab2 | | Absence | | | | | | | | | |
| | | | Echar | ntillon | s de B | ois | | | | | |
| B-020 | | Absence | | | | | | | | | |
| B-051 | | Absence | | | | | | | | | |
| B-BR1 | | Absence | | | | | | | | | |
| B-BC2 | | Absence | | | | | | | | | |
| B-BC4 | | Absence | | | | | | | | | |
| B-CCA2 | | Présence | Х | Х | | Х | | | Impossible à définir | | |

Tableau 32 : Caractéristiques de l'ensemble des échantillons environnementaux

Pour la toxicité globale, un code couleur est utilisé : vert signifie peu toxique, orange moyennement toxique et rouge, fortement toxique. Présence ou absence de métaux correspond à l'estimation selon les résultats des bioéléments bactériens.

3. Conclusion

Lors de cette étude, trois bioéléments bactériens ont été construits. Initialement conçus pour détecter le chrome, le plomb et l'or, il s'avère que leurs spécificités sont multiples. En effet, le bioélément *E. coli* pBpbrlux détecte le plomb, le cadmium ainsi que le zinc. De même, le bioélément *E. coli* pBgollux possède une spécificité de détection pour l'or, le cuivre et l'argent. Seule la souche *E. coli* pUCchrlux est spécifique, puisqu'elle ne permet que la détection du chrome sous sa forme trivalente en conditions fraiches. Cependant, la forme lyophilisée ne permet plus cette détection.

Ceci est notamment expliqué par la présence de cryoprotectant et du procédé de lyophilisation à proprement parler. Du fait de l'impossibilité d'utiliser cette souche en conditions lyophilisées, celle-ci n'a pas été exploitée dans ces études.

Additionnées aux quatre bioéléments précédemment construits (Charrier et al. 2011), l'effectif des souches détectrices augmente à six, accroissant aussi le nombre de métaux identifiés à 7. En effet, par le couplage des réponses des souches détectrices, il est alors possible de distinguer et de discriminer la présence d'arsenic, de cuivre, de mercure, de cadmium, de plomb, de zinc et de chrome dans un mélange complexe. Ceci est d'autant plus intéressant que trois de ces métaux figurent parmi la liste de substances prioritaires à réduire ou à éliminer dans le domaine de l'eau (Directive 2000/60/CE). Une limitation est toutefois visible avec la souche *E. coli* pBpbrlux, pour laquelle les faibles niveaux de bioluminescence ne nous permettent pas de l'intégrer au sein d'analyses semi-quantitatives par arbres de décision.

Les bioéléments construits ont ensuite été utilisés dans le cadre de la caractérisation de la contamination métallique d'échantillons environnementaux. Cette étude couple une estimation de la toxicité globale et une étude spécifique destinée à quantifier la concentration de six métaux. Cette quantification est réalisée par le biais de d'analyses chimiques permettant de définir la concentration des métaux mobilisables ainsi que par le biais d'analyses par bioéléments bactériens permettant d'estimer la concentration des métaux biodisponibles. Il est intéressant de noter que bien souvent, les métaux biodisponibles ne représentent qu'une petite fraction par rapport aux métaux mobilisables. Cependant, par l'évaluation des métaux mobilisables et biodisponibles, il est possible de mettre en évidence la présence d'interactions entre métaux, que celles-ci soient antagonistes, synergiques ou additives.

Une réserve peut cependant être émise par rapport au protocole de l'étude. Dans la littérature, il est montré que l'efficacité d'extraction des métaux est dépendante de la nature des métaux, de leurs propriétés de solubilité et de mobilité dans l'eau et *a fortiori*, dépendante du pH. Cependant, la lixiviation des échantillons solides a été réalisée en eau distillée. Ce choix se justifie par le fait que ce sont des conditions qui se rapprochent le plus de celles qui peuvent être rencontrées dans l'environnement (Foucault et al. 2013).

Ainsi, les souches rapportrices bioluminescentes développées au cours de cette étude sont d'un réel intérêt et leur utilisation apporte un premier élément de réponse quant à la recherche de métaux et à leur quantification dans un échantillon environnemental. Cette étude est d'autant plus intéressante

du fait qu'elle ne nécessite que de faibles volumes d'échantillons, contrairement aux analyses chimiques qui requièrent autant d'analyses que de métaux à doser. Ceci est notamment illustré avec l'exemple des échantillons de bois pour lesquels, du fait de volumes limités, l'analyse chimique n'a pas pu être réalisée. Cependant, la caractérisation de la toxicité et l'estimation de la contamination métallique a toutefois pu être réalisée par le biais des souches bioluminescentes.

En complément à ces premiers travaux, la caractérisation de ces échantillons sera approfondie par l'étude des régulations au niveau transcriptomique, c'est-à-dire l'analyse de l'ensemble des transcrits de la bactérie *E. coli* en réponse aux divers échantillons. Son développement fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DE LA CONTAMINATION METALLIQUE A L'AIDE DE PROFILS TRANSCRIPTOMIQUES

1. Introduction

L'analyse d'un échantillon complexe au moyen de bactéries bioluminescentes donne une somme de réponses monoparamétriques dont l'association des réponses apporte une mesure spécifique. Néanmoins, une autre approche à étudier est l'association de signaux monoparamétriques non spécifiques issus de l'ensemble des signaux d'un génome entier, en vue d'identifier une réponse spécifique.

Afin de mettre en place cette analyse transcriptomique à l'échelle du génome, deux points sont abordés. Dans un premier temps, il s'agit de définir les conditions opératoires et analytiques relatives à l'utilisation d'une collection de souches fluorescentes. En effet, de par le nombre de souches utilisées et la diversité des échantillons étudiés, il est nécessaire de définir et d'optimiser les paramètres analytiques. Suite à la validation de la méthodologie, celle-ci sera dans un second temps appliquée à des échantillons de laboratoire et l'analyse des données transcriptomiques sera réalisée.

2. Résultats et discussion

2.1. Etude préliminaire : choix des concentrations des métaux

Antérieurement à l'exposition des bactéries de la collection de souches fluorescentes par les métaux, il est nécessaire de définir les concentrations métalliques à appliquer. Pour cela, des tests de toxicité par mesure de l'inhibition de croissance ont été réalisés.

Le choix s'est porté sur trois concentrations définies de sorte à avoir une concentration non toxique (C1), une concentration à la limite de la toxicité (C2), ainsi qu'une concentration pour laquelle on observe des effets toxiques (C3). Cette dernière a été fixée comme étant la Concentration Inhibitrice 25 (Cl₂₅), c'est-à-dire la concentration de métal pour laquelle une diminution de 25% de la vitesse de croissance est observée. Les résultats pour les tests de toxicité en présence d'arsenic sont présentés dans la Figure 45.



Figure 45 : Test de toxicité de l'arsenic sur la souche E. coli U139

(A) Cinétique de croissance de la souche *E. coli* U139 en présence d'arsenic. (B) Courbe représentant le taux d'inhibition de croissance en fonction de la concentration d'arsenic, calcul selon la macro Regtox.
 100 μL de bactéries sont additionnés de 25 μL de métal. Culture en milieu HEPES, à 37°C. Résultats issus de trois essais indépendants.

En absence d'arsenic, l'absorbance à 5 heures atteint 0,3 avec un taux de croissance de 0,41 h⁻¹. Audelà de 125 μ M et avec l'augmentation des concentrations d'arsenic, on observe une diminution de la vitesse de croissance, visible notamment à partir d'une concentration de 1 110 μ M d'arsenic. Audelà de 10 000 μ M d'arsenic, la croissance est nulle et les concentrations appliquées sont létales pour la bactérie (Kalantari and Ghaffari 2008; Behera et al. 2014). Le calcul de la vitesse de croissance pour chacune des concentrations permet de définir différentes valeurs de concentrations inhibitrices. Dans le cas de l'arsenic, les valeurs C1, C2 et C3 sont fixées à 25, 505 et 1 915 μ M respectivement. Ces mêmes analyses ont aussi été réalisées pour les cing autres métaux (cuivre, mercure, cadmium, zinc et plomb) (résultats non présentés). Les concentrations utilisées pour l'exposition sont répertoriées dans le chapitre Matériel et méthodes, Tableau 23.

Une fois les concentrations d'exposition déterminées pour l'ensemble des métaux, la collection a été induite et la mise en place d'une méthodologie de traitement de données a été réalisée.

2.2. Méthode de traitement des données transcriptomiques selon Elad and Belkin (2013)

2.2.1. Présentation de la méthode selon Elad and Belkin (2013)

Lors des travaux réalisés par Elad and Belkin (2013), le prétraitement de données suivant a été utilisé. Une première étape consiste en la normalisation de la fluorescence vis-à-vis de la biomasse bactérienne. La population bactérienne peut varier significativement selon la richesse en matières organiques de l'échantillon. C'est pourquoi il est nécessaire de normaliser la fluorescence par rapport à l'absorbance. Pour cela, la valeur g_i est calculée pour chaque gène :

Avec :

$$g_i = \frac{RFU_g}{A_g}$$
 $- g_i$: expression normalisée du gène g
 $- RFU_g$: fluorescence du gène g
 $- A_g$: absorbance de la culture correspondant au gène g

Dans un second temps, l'expression du gène g_i est standardisée. La méthodologie d'analyse se base sur la différence de fluorescence entre la condition induite (échantillon à tester) et non induite (eau distillée), le tout étant rapporté à la variabilité de la condition non induite (eau distillée). En d'autres termes, il s'agit de comparer l'expression du gène g_i en conditions induites vis-à-vis de la dispersion du même gène g_i en conditions non induites. Ce calcul est intéressant car il tient compte des variabilités observées pour la condition témoin. Le calcul réalisé est le suivant :

Avec :

$$g^{s} = \frac{g_{i} - \mu_{c}(g)}{\sigma_{c}(g)}$$
- g^{s} : expression centrée réduite du gène g_{i}
- g_{i} : expression normalisée du gène g pour la condition induite
- $\mu_{c}(g)$: moyenne de la valeur g_{i} pour la condition non induite
- $\sigma_{c}(g)$: écart type de la valeur g_{i} pour la condition non induite

Le gène g est considéré comme activé lorsque la valeur g^s est supérieure à 2.

Suite à la description de la méthode de traitement des données, celle-ci a été appliquée en présence de l'ensemble des 43 échantillons étudiés au cours de cette étude.

2.2.2. Application de la méthode selon Elad and Belkin (2013) aux 43 échantillons de l'étude

Le calcul appliqué selon Elad and Belkin (2013) fait intervenir la valeur g_i, c'est-à-dire le rapport entre la fluorescence et l'absorbance. Leurs valeurs pour les échantillons étudiés dans cette étude sont présentées dans le Tableau 33.

| Echontillon | Fluoresce | ence (RFU) | Absorban | a. | |
|---------------------------------|-----------|------------|----------|------------|--------|
| Echantinon | Moyenne | Ecart type | Moyenne | Ecart type | Bi |
| Eau distillée | 3277 | 245,4 | 0,086 | 0,004 | 38 105 |
| Métaux en eau distillée (E) | 3501,3 | 255,9 | 0,080 | 0,004 | 43 766 |
| Métaux en eau de rivière (R) | 3071,6 | 310,5 | 0,064 | 0,008 | 47 994 |
| Lixiviats de Sédiment (Ref-Sed) | 3763,0 | 325,4 | 0,090 | 0,009 | 41 811 |
| Lixiviats de Terre (T) | 9215,7 | 2087,7 | 0,106 | 0,005 | 86 941 |
| Solvay (Sol) | 4579,5 | 254,8 | 0,096 | 0,005 | 47 703 |
| Lixiviats de Bois (B) | 9593,8 | 2114,2 | 0,105 | 0,032 | 91 370 |

Tableau 33 : Fluorescence et absorbance intrinsèque des échantillons étudiés

Fluorescence et absorbance en présence de 100 µL de bactéries + 25 µL d'échantillon. Mesure réalisée à 3 heures, à 37°C.

L'ensemble des échantillons présentent des valeurs d'absorbance proches du témoin eau distillée, avec peu de variations intra-échantillons (faibles écart-types). Cependant, ceci n'est pas le cas de la fluorescence, paramètre pour lequel on observe des disparités plus importantes. Alors que les échantillons de métaux en eau distillée, en eau de rivière et les lixiviats de sédiment présentent des valeurs de fluorescence proches de celles de l'eau distillée, les lixiviats de Terre et de Bois présentent des valeurs de fluorescence près de trois fois plus importantes (valeurs > 9000 RFU pour les lixiviats de terre et de bois contre 3277 RFU en présence d'eau distillée).

Selon Elad and Belkin (2013), le calcul de g^s fait intervenir le calcul g_i - μ_c , c'est-à-dire une différence entre les conditions induites et non induites. Ceci est applicable dans le cadre de leurs études, au cours de laquelle des échantillons d'eau distillée contaminée ou non ont été utilisés. Dans le cas de l'étude d'échantillons environnementaux et face à l'impossibilité d'obtenir des échantillons de même nature exempts de contamination, le témoin non contaminé utilisé au cours de ces travaux a été de l'eau distillée. Or, dans le cas où l'échantillon possède une fluorescence intrinsèque naturelle (exemple des lixiviats de bois par exemple), la valeur de g^s intègre la fluorescence intrinsèque de l'échantillon, ce qui peut fausser l'interprétation des données vis-à-vis de la transcription des gènes. Ainsi, la valeur de g^s est biaisée par la fluorescence intrinsèque à l'échantillon et l'utilisation de la valeur g^s n'est pas correcte.

Un second biais est constaté lors de la validation des témoins. Pour rappel, sur chaque plaque sont placés deux souches promoterless (U139 et U66) représentant la fluorescence basale. La valeur deFI pour ces deux souches doit alors être proche de 1, ce qui correspond à une absence d'expression. Cependant, suite à l'analyse des résultats selon cette méthode, on observe que de nombreuses souches présentent des valeurs de g^s supérieures à 2, invalidant dès lors les résultats de l'ensemble de la plaque. En effet, ceci correspondrait à l'activation d'un promoteur alors que celui-ci n'est pas présent. Ce résultat pourrait s'expliquer par la fluorescence intrinsèque de l'échantillon, comme précédemment démontré.

Enfin, selon cette méthode, le gène g est considéré comme activé lorsque la valeur g^s est supérieure à 2. Ceci constitue une limitation dans l'interprétation des résultats, cette définition ne prenant pas en compte les gènes dont l'expression est réprimée par rapport au témoin.

Ainsi, le prétraitement des données utilisé dans le cadre de l'étude réalisée par Elad et Belkin (2013) est applicable avec l'utilisation d'échantillons de laboratoire uniquement, c'est-à-dire des échantillons d'eau distillée contaminée ou non. Cependant, dans notre cas, aux vues des limitations et des incohérences biologiques dues à la méthode, elle ne peut être appliquée. C'est pour cela qu'une nouvelle méthode de traitement des données a été établie.

2.3. Développement d'une nouvelle méthode d'analyse sur les échantillons en eau distillée contaminés en métaux (E)

Au cours de cette partie, l'analyse des données sera réalisée sur les 18 échantillons en eau distillée contenant les métaux (E) uniquement. Ce choix se justifie par le fait qu'il convient d'établir la méthode d'analyse sur des échantillons de laboratoire connus et caractérisés. Les 18 échantillons de métaux en eau distillée représentent les six métaux, chacun présents aux trois concentrations C1, C2 et C3. L'ensemble des tests est réalisé en duplicat (essais 1 et 2), ce qui conduit à un total de 36 conditions testées (Figure 46).



Figure 46 : Détail des conditions d'exposition en présence des métaux préparés dans de l'eau distillée

Pour mettre en place la nouvelle méthode de calcul, les paramètres critiques mis en évidence, c'està-dire l'influence de la biomasse bactérienne, les caractéristiques des échantillons (notamment de fluorescence intrinsèque), ainsi que la fluorescence basale des souches bactériennes seront tour à tour étudiés et pris en compte dans l'établissement de la nouvelle formule de calcul. Pour rappel, la fluorescence basale des souches est reflétée par le biais des deux souches promoterless (U66 et U139) présentes sur chacune des 21 plaques.

2.3.1. Mise en place de la méthode

Les figures 47 et 48 représentent la moyenne des valeurs d'absorbance et de fluorescence respectivement des deux souches promoterless pour l'ensemble des 36 conditions testées pour les plaques 1 à 21. Par ce moyen, nous cherchons à définir si *(i)* il existe des variations de ces paramètres selon les conditions, c'est-à-dire si le protocole expérimental est robuste selon les 36 essais réalisés, et si *(ii)* des variations sont observées en fonction des plaques.

2.3.1.1. Absorbance des souches promoterless selon les plaques

Dans un premier temps, les variations d'absorbance des souches promoterless ont été étudiées pour l'ensemble des 36 conditions (Figure 47).



Figure 47 : Absorbance moyenne des souches promoterless selon la plaque de bactéries Valeurs de l'absorbance pour les souches promoterless : 2 puits par plaque, pour les 36 conditions métalliques. 100 μL de bactéries sont additionnés de 25 μL d'échantillon. Culture en milieu HEPES, à 37°C, lecture à 3 heures après exposition.

Pour l'ensemble des conditions testées, l'absorbance des souches promoterless est stable et atteint la valeur de 0,160 \pm 0,011. Ainsi, les variations d'absorbance pour l'ensemble des échantillons sont peu importantes et négligeables. De plus, ce résultat est répétable pour les 21 plaques. Ainsi, malgré le fait que la concentration C3 ait été choisie pour les effets qu'elle entraine sur la croissance bactérienne (Figure 45), on n'observe pas de différences sur le développement bactérien dans les conditions testées.

2.3.1.2. Fluorescence des souches promoterless selon les plaques

Dans un second temps, les variations de fluorescence des souches promoterless ont été étudiées pour l'ensemble des 36 conditions (Figure 48).



Figure 48 : Fluorescence moyenne des souches promoterless selon la plaque de bactéries Valeurs de fluorescence pour les souches promoterless : 2 puits par plaque, pour les 36 conditions métalliques. 100 μL de bactéries sont additionnés de 25 μL d'échantillon. Culture en milieu HEPES, à 37°C, lecture à 3 heures après exposition.

Les valeurs de fluorescence intra-plaque sont majoritairement peu variables, comme le montre leur faible écart-type. Seules les plaques 2, 3, 4 et 21 présentent des variations plus importantes (> 10%). Malgré une fluorescence intra-plaque stable, la fluorescence inter-plaques varie. En effet, alors qu'elle est de 10 462 ± 947 RFU pour la plaque 1, la fluorescence moyenne de la plaque 5 est de 20 645 ± 1 504 RFU, tandis que celle de la plaque 18 est de 3 459 ± 504 RFU. Du fait que ces disparités soient réparties de manière aléatoire au sein des différentes plaques de la collection, mais répétables selon les essais, ce phénomène ne peut pas avoir pour cause l'opérateur.

Ainsi, la fluorescence des souches promoterless d'une plaque donnée est reproductible selon les essais et les conditions d'exposition. Cependant, du fait que la fluorescence basale varie selon la plaque, il est nécessaire d'en tenir compte lors de l'analyse des résultats et du calcul du facteur d'induction.

2.3.1.3. Etablissement de la formule pour le calcul du facteur d'induction

Pour le calcul du facteur d'induction, la formule mise en place doit tenir compte des critères mis en évidence précédemment.

- Antérieurement à l'exposition, les effets du toxique sur la viabilité bactérienne doivent être vérifiés, via la réalisation d'un test de toxicité via l'inhibition de la croissance. En effet, il est nécessaire que les échantillons n'entrainent pas une mortalité importante des bactéries afin qu'elles puissent produire la protéine rapportrice.
- Il est possible que certains échantillons riches en matières organiques favorisent le développement bactérien. De ce fait, une normalisation de la fluorescence vis-à-vis de la biomasse bactérienne est nécessaire.
- Une régulation de l'expression du promoteur implique que celui-ci soit initialement exprimé.
 Pour cela, l'expression du gène g doit être supérieure à l'activité des souches promoterless, ces dernières reflétant le niveau basal de fluorescence.
- 4) Enfin, pour que le test soit considéré comme valide, il s'agit de vérifier deux points. Le milieu de culture ne soit pas être contaminé, ceci étant vérifiable par une absence de croissance au sein du puits ne contenant que du milieu (puits Empty). De plus, des témoins rapportant l'activité basale des souches sont présents sur l'ensemble des 21 plaques composant la collection de souches. Il est alors nécessaire que les deux souches promoterless (U139 et U66) ne soient pas induites.

La formule suivante est proposée :



Avec FI : Facteur d'Induction, RFU : fluorescence et A_{620} : Absorbance à 620 nm

Le rapport RFU/A₆₂₀ permet la normalisation de la fluorescence vis-à-vis de la biomasse. Ensuite, la différence entre les valeurs de RFU/A₆₂₀ entre la souche rapportrice et les souches promoterless permet d'une part de s'assurer que le gène g est bien exprimé et d'autre part, de s'affranchir d'une éventuelle fluorescence de l'échantillon. Enfin, le rapport entre la condition d'essai et la condition témoin permet de calculer le facteur d'induction et de caractériser l'expression du gène g. Une valeur de FI supérieure à 2 indique que le promoteur est activé, et une valeur de FI inférieure à 0,5 indique que celui-ci est réprimé. Ces valeurs seront par la suite normalisées, comme décrit dans le chapitre Matériel et méthodes, paragraphe 4.2.

Suite à la mise en place de la méthode de calcul, une analyse fonctionnelle des transcrits pour les échantillons ne contenant que les métaux a été réalisée. La concordance des fonctions régulées entre cette étude et les données de la littérature permettra la validation de la méthode de calcul mise en place précédemment.

2.3.2. Validation de la méthodologie d'analyse

2.3.2.1. Description des données transcriptomiques

i) Etude des réponses transcriptomiques selon les différentes concentrations

La collection de souches fluorescentes a été induite en présence des six métaux, avec trois concentrations par métal, ainsi qu'à un mélange composé de six métaux. Le nombre de transcrits régulés en fonction des conditions sont présentés dans le Tableau 34.

| Métal | C1 | C2 | C3 | Nombre total de gènes régulés par métal | |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------------------|--|
| Arsenic | 20 (1,1 %) | 32 (1,8 %) | 32 (1,8 %) | 84 (4,6 %) | |
| Cuivre | 36 (2,0 %) | 72 (4,0 %) | 88 (4,9 %) | 196 (10,8 %) | |
| Mercure | 38 (2,1 %) | 46 (2,5 %) | 38 (2,1 %) | 122 (6,7 %) | |
| Cadmium | 18 (1,0 %) | 80 (4,4 %) | 43 (2,4 %) | 141 (7,8 %) | |
| Zinc | 20 (1,1 %) | 52 (2,9 %) | 58 (3,2 %) | 130 (7,2 %) | |
| Plomb | 21 (1,2 %) | 44 (2,4 %) | 86 (4,8 %) | 151 (8,3 %) | |
| Mélange de métaux | - | 99 (5,5%) | - | - | |

Pour les concentrations de métal utilisées, se référer au chapitre Matériel et Méthodes, Tableau 23. Entre parenthèses est figuré le pourcentage de gènes régulés par rapport aux nombre total de souches (1 810 souches). En gras sont représentés les métaux pour lesquels les régulations de transcrits sont les plus faibles/importantes.

Pour l'ensemble des conditions, peu de gènes sont régulés. En dehors de la condition mélange de métaux, moins de 5% des gènes possèdent une expression différente par rapport à la condition témoin eau distillée. Cependant, malgré ce faible taux, il est toutefois possible de dresser des tendances de régulation. Pour la concentration C1, le nombre de gènes régulés est compris entre 18 et 38. Pour la concentration C2, ce nombre est compris entre 32 et 80. Enfin, pour la concentration C3, ce nombre est compris entre 32 et 88. Ainsi, avec l'augmentation des concentrations, on observe une variabilité de réponse plus importante, traduisant le fait que les effets physiologiques sont plus aléatoires entre la concentration C1 non toxique, la concentration C2 à la limite de la toxicité et la concentrations non toxiques C1 et C2, le nombre de gènes régulés augmente pour tous les métaux. Ceci n'est pas systématiquement le cas entre les concentrations C2 et C3, pour lesquelles le nombre de gènes régulés augmente (cuivre, zinc et plomb) ou diminue (mercure et cadmium) selon le métal.

Avec 196 transcrits régulés toutes concentrations confondues, le cuivre est le métal pour lequel les régulations sont les plus nombreuses. Ceci s'explique par le fait que ce métal essentiel soit utilisé en tant que cofacteur de réactions d'oxydo-réduction, mais présente des effets toxiques en excès du fait de sa haute réactivité chimique. Ainsi, la concentration de cuivre intracellulaire est hautement contrôlée, en conséquence le nombre de gènes régulés est lui aussi important (Festa and Thiele 2011; Argüello et al. 2013).

Après avoir étudié les régulations géniques dans leur ensemble, les recoupements de gènes entre différentes conditions d'exposition sont ensuite abordés.

ii) Etude des réponses transcriptomiques pour différents métaux

Les recoupements entre les différents métaux à effet toxique égal (ici, la concentration C2) ont été étudiés (Tableau 35).

| Métal | Arsenic | Cuivre | Mercure | Cadmium | Zinc | Plomb | Mélange |
|---------------|---------|--------|---------|---------|------|-------|---------|
| Gènes régulés | 32 | 72 | 46 | 80 | 52 | 44 | 99 |
| Arsenic | Х | 8 | 8 | 5 | 5 | 1 | 2 |
| Cuivre | | Х | 11 | 14 | 5 | 3 | 4 |
| Mercure | | | Х | 11 | 13 | 2 | 5 |
| Cadmium | | | | Х | 10 | 3 | 23 |
| Zinc | | | | | Х | 4 | 6 |
| Plomb | | | | | | Х | 7 |
| Mélange | | | | | | | Х |

Tableau 35 : Nombre de gènes recoupés entre différents métaux à la concentration C2

A effet toxique similaire (concentration C2), on retrouve peu de recoupements de gènes. En effet, en réponse au cuivre et au cadmium, pour lesquels on observe 72 et 80 gènes régulés respectivement, seuls 14 gènes sont régulés de manière identique (encadré **bleu foncé**). De même pour le plomb et le zinc (44 et 52 transcrits régulés respectivement), seuls 4 transcrits sont identiques entre les deux conditions (encadré **turquoise**). Chaque métal possède une réponse qui est spécifique et peu de transcrits sont identiques sur l'ensemble des six conditions métalliques.

Les recoupements de gènes entre différentes concentrations d'un même métal ont été étudiés (Figure 49). Par exemple, dans le cas de l'arsenic, 20, 32 et 32 transcrits sont respectivement régulés pour les concentrations C1, C2 et C3. Cependant, seul 1 transcrit est régulé de manière similaire entre la concentration C1 et C3. De même, il y a aussi 1 transcrit commun aux concentrations C2 et C3. Enfin, aucun transcrit n'est régulé de manière commune aux trois concentrations C1, C2 et C3. Les conclusions observées dans le cas de l'arsenic sont aussi observées pour les autres métaux, c'est-à-dire que les gènes régulés ne se recoupent que rarement entre les différentes concentrations d'un même métal. Ainsi, les effets observés sont très spécifiques de la concentration de métal et *a fortiori*, de la toxicité associée. Il à noter cependant que, parmi les six métaux testés, seul le cuivre possède un transcrit qui est régulé de manière identique entre les trois concentrations. Ce gène, à savoir *cusR*, est impliqué dans le métabolisme du cuivre spécifiquement.



Figure 49 : Diagrammes de Venn représentant le nombre de gènes qui sont régulés de manière identique entre les concentrations C1, C2 et C3.

Ainsi, pour l'ensemble des conditions de métal testées, on retrouve peu de recoupements entre gènes, la réponse est spécifique de la nature du métal. De plus, pour un métal donné, les regroupements de gènes entre deux concentrations sont peu nombreux et les regroupements de gènes entre les trois concentrations sont encore plus faibles. Ainsi, l'ensemble de ces résultats met en évidence que le comportement bactérien en réponse à un métal est propre d'une part à la nature de celui-ci et d'autre part, aux effets toxiques relatifs à la concentration. Ainsi, des profils différents sont visibles selon le métal, ainsi que la concentration de celui-ci. Dans la suite des travaux, il l'objectif est de déterminer si les fonctions régulées en réponse aux métaux sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature. Ceci nous permettra de valider ou non la méthode de calcul précédemment mise en place dans la première partie de ce chapitre (paragraphe 2.3.1.3).

Les métaux étudiés sont l'arsenic (A), le cuivre (B), le mercure (C), le cadmium (D), le zinc (E) ainsi que le plomb (F). Le cercle vert correspond à la concentration C1, le cercle orange, à la concentration C2, et le cercle rouge correspond à la concentration C3. Les nombres des gènes régulés qui se recoupent entre deux concentrations sont affichés au sein des différents cercles.
2.3.2.2. Analyse fonctionnelle des gènes régulés

Dans cette partie, les régulations transcriptomiques en réponse aux métaux obtenues par puce à ADN et par la collection de souches seront comparées. Par la concordance de leurs réponses, la méthodologie d'analyse développée au cours de ces travaux pourra alors être validée.

Dans cette partie, deux conditions vont plus particulièrement être analysées du point de vue fonctionnel, à savoir les réponses liées à la présence de cuivre et les réponses liées à un mélange de métaux. Dans le cas du cuivre, ce choix s'explique par son caractère essentiel, lié à une forte régulation de gènes. Dans le cas du mélange, il est intéressant d'étudier et de comparer les effets d'un mélange de plusieurs métaux.

i) Réponse au cuivre

L'ensemble des régulations en réponse au cuivre sont décrites dans le Tableau 36.

| Rôle | C1 | C2 | С3 | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|--|--|--|
| Métabolisme du cuivre | | | | | | |
| Export du cuivro | cusR (6,2) | cusR (8,0) | cusR (28,5) | | | |
| | | <i>cusC</i> (21,5) | cusC (47,5) | | | |
| Homéostasie du fer | fes (16,8) | <i>fes</i> (4,5) | fes (13,0) | | | |
| Assimilation du for | cirA (3,8) | yqjH (9,17) | fhuA (2,2) | | | |
| Assimilation du lei | | <i>fecA</i> (4,0) | fhuF (3,3) | | | |
| Métabo | lisme des protéines et s | tress oxydant | | | | |
| | | htpX (8,2) | | | | |
| Régulon <i>cpx</i> | | mraZ (5,0) | | | | |
| | | <i>ppiA</i> (4,3) | | | | |
| | | | fpr (16,1) | | | |
| Régulon sox | | | sodA (42,9) | | | |
| | | | soxS (4,6) | | | |
| Synthàsa das flagallas | | | flgM (2,4) | | | |
| Synthese des nagenes | | | <i>fliC</i> (8,4) | | | |
| | Métabolisme seconda | aire | | | | |
| Polysaccharides | glgB (5,4) | | | | | |
| Acides gras | fadE (6,0) | fabB (3,3) | | | | |
| Acides aminés | | argA (3,0) | | | | |
| Coenzyme | | | metK (0,24) | | | |

Tableau 36 : Récapitulatif des voies métaboliques impactées en présence de cuivre

Entre parenthèses sont indiquées les valeurs de facteur d'induction.

• Métabolisme du cuivre

En réponse au cuivre, on observe l'activation du système d'efflux du cuivre, via l'activation de l'opéron *cus*. De plus, cette réponse est concentration dépendante, comme démontré avec l'augmentation des facteurs d'induction du gène *cusR* (Munson et al. 2000; Yamamoto and Ishihama 2005). Cependant, la concentration C1 conduit à l'activation du promoteur *PcusR*, mais pas celui de *PcusCFBA*. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les concentrations de cuivre ne soient pas assez importantes (concentration C1 non toxique) pour activer l'efflux de ce métal en dehors de la cellule.

De plus, on observe une modification dans le métabolisme du fer. Du fait de similarités physicochimiques, des réactions de compétition entre les deux métaux ont été décrites chez la bactérie *E. coli*, le cuivre inhibant l'absorption du fer et réciproquement (Arredondo and Núñez 2005). Ce même phénomène a aussi été mis en évidence chez d'autres organismes, par exemple chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que sur cellules humaines Caco-2 (Gross et al. 2000; Arredondo et al. 2006). Un changement d'homéostasie du cuivre entraine une diminution dans l'assimilation du fer. Ainsi, on observe l'activation des gènes spécifiques liés à l'homéostasie du fer afin de compenser la diminution de la concentration en fer.

• Métabolisme des protéines et stress oxydant

A la concentration C2, on observe une activation du régulon *cpx*, responsable de la détection et de la dégradation des protéines mal repliées par les protéases. En présence de la concentration C3, on observe une activation du régulon *sox* impliqué dans la réponse au stress oxydant ainsi que l'augmentation de la synthèse des flagelles. Ces changements s'expliquent par le niveau de toxicité des concentrations utilisées. En effet, à la concentration sub-toxique C2, les protéines chaperons transcrites à partir du régulon *cpx* sont suffisantes pour gérer le pool de protéines non fonctionnelles. Avec l'augmentation de la concentration en métal, les protéines chaperons ne sont plus suffisantes pour parer aux effets adverses, expliquant ainsi l'apparition des effets toxiques (Garrick et al. 2003). En conséquence, on observe l'augmentation de l'expression des gènes répondant au stress oxydant (régulon *sox*) et des gènes responsables de la synthèse des flagelles. En effet, par l'augmentation de la mobilité bactérienne, la bactérie peut alors fuir les environnements toxiques (Andres and Bertin 2016).

• Métabolisme secondaire

Aux concentrations de cuivre n'entrainant pas de toxicité (C1 et C2), on observe une activation de la synthèse de certains métabolites secondaires, tels que les acides gras par exemple. Cependant, avec une concentration entrainant des effets toxiques (C3), on observe un ralentissement de l'activité

métabolique cellulaire, notamment par la répression de la synthèse du S-adenosyl-méthionine. La synthèse des métabolites secondaires est activée en présence de concentrations non toxiques de cuivre, mais réprimée dans le cas contraire. Ces effets peuvent s'expliquer par le fait qu'en conditions toxiques, la bactérie modifie son métabolisme dans le but de conserver son énergie (Wang and Crowley 2005). Ainsi, comme précédemment observé, les régulations sont dépendantes de la concentration de cuivre et plus particulièrement, sont dépendantes du niveau de toxicité associé.

La réponse au cuivre entraine de nombreuses régulations. Par comparaison aux régulations observées dans la littérature, les réponses sont identiques avec les résultats obtenus par l'analyse transcriptomique. Ainsi, la similarité des réponses entre notre étude et celle menée par Kershaw et al. (2005) valide dès lors l'approche analytique mise en place (cf. Synthèse bibliographique, paragraphe 3.2.1.1).

ii) Réponse à un mélange de métaux

En réponse au mélange des six métaux (E-Mélange), on observe l'activation du métabolisme du cuivre (*cusC*) et du fer (*cirA* et *katG*), ainsi que l'activation de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (*yciW*, *ydjL* et *ygeG*). Au contraire, on observe la répression de nombreux gènes liés au transport des nucléosides (*nupC*, *nupG* et *codB*) et des acides aminés (*ydg1*), ainsi que la répression d'une protéine précurseur de la synthèse des acides aminés aromatiques (*shiA*). En réponse au mélange de métaux, on n'observe pas l'induction des voies spécifiques dépendantes de la nature de chaque métal, à savoir l'activation des transporteurs de cuivre, de zinc, ou de cadmium par exemple, mais plutôt une réponse générale de la bactérie vis-à-vis des stress générés, à savoir des mécanismes de protection contre les agents oxydants.

En comparant les résultats obtenus avec l'étude de Gómez-Sagasti et al. (2014), on observe une similarité dans les voies activées, c'est-à-dire l'intervention des gènes impliqués dans la régulation du fer, de même que ceux impliqués dans la réponse au stress oxydant (cf. Synthèse bibliographique, paragraphe 3.2.1.2). Cependant, quelques différences entre les deux études sont visibles, notamment dans le profil de réponse des gènes réprimés. Ceci peut s'expliquer par les conditions de l'expérimentation. En effet, ni la densité bactérienne, ni le milieu utilisé ne sont identiques. De plus, les métaux impliqués dans chacun des mélanges est différent. Des relations de synergisme ou d'antagonisme entre métaux peuvent alors impacter la réponse bactérienne. Ainsi, la concordance des réponses transcriptomiques entre les réponses obtenues au cours de cette étude et les données de la littérature, sur deux cas d'étude (cuivre et mélange de métaux) valide la méthode de traitement de données mise en place (cf. Chapitre 3, paragraphe 2.3.1.3).

2.3.1. Visualisation des résultats relatifs aux régulations transcriptomiques

Une fois validée, la formule a été appliquée et les réponses de l'ensemble des souches sont représentés dans la Figure 50.



Figure 50 : Cartes représentant les régulations transcriptomiques en réponse aux différents métaux à la concentration C2 Métaux Arsenic (A), Cuivre (B), Mercure (C), Cadmium (D), Zinc (E) et Plomb (F). Les valeurs affichées sont les facteurs d'induction, avec la fourchette [-100 ;0 [de bleu à vert pour les transcrits réprimés et la fourchette] 0 ; 100] de vert à rouge pour les transcrits activés. La valeur 0 (vert) représente les transcrits pour lesquels l'expression n'est pas régulée. Résultats issus de deux expériences indépendantes. Réprésentation selon un format 18 x 100 pour la représentation de l'ensemble des 1 810 transcrits uniques de la collection.

Ces cartes représentent les régulations des 1 810 souches transcriptionnelles uniques, selon la condition d'exposition métallique. Selon le métal impliqué, le profil de réponse obtenu est différent et, du fait de l'importance des données, l'interprétation des résultats est difficile. C'est pourquoi dans la partie suivante va être abordée l'analyse des données, c'est-à-dire dans un premier temps l'analyse des régulations de l'expression des gènes puis dans un second temps, la mise en place de profils de réponse spécifiques. Cette étude est réalisée sur l'ensemble des 43 échantillons de l'étude.

2.4. Description de l'ensemble des échantillons vis-à-vis de leurs régulations transcriptomiques

Au cours de ce chapitre, l'ensemble des 43 échantillons, à savoir des échantillons artificiels de laboratoire contaminés avec des métaux en eau distillée (E) ou en eau de rivière (R), des échantillons liquides issus de l'industrie chimique (Sol), ainsi que des lixiviats issus d'échantillons de terre (T), de bois (B) ou de sédiment (Ref-Sed) vont être décrits. Pour cela, une représentation des résultats en clustergramme est réalisée. Le clustergramme est issu de la combinaison de deux dendrogrammes³, un dendrogramme sur le haut classant les échantillons ainsi qu'un dendrogramme sur la droite qui classe les transcrits. Ces deux dendrogrammes sont reliés par une carte qui représente l'expression de chacun des transcrits pour chacune des conditions (colonne) selon une réponse en activation, en absence de régulation ou en répression. Les résultats de cette analyse sont visibles sur la Figure 51.



Figure 51 : Clustergramme représentant les régulations pour l'ensemble des 43 échantillons environnementaux. Sur cette figure sont décrits les 43 échantillons (lecture verticale) pour les 1 810 transcrits (lecture horizontale). En rouge sont représentés les gènes activés en vert, les gènes réprimés et en noir, les gènes qui ne sont pas régulés.

³ Un dendrogramme est un arbre hierarchique, qui en plus d'illustrer les liaisons entre les groupes, permet aussi de définir leur niveau de proximité, via la longueur de la branche.

Selon cette représentation, on peut distinguer la présence de groupes basés sur la nature de l'échantillon. En effet, on observe un groupe lié à la matrice Terre, un groupe lié à la matrice Bois, un autre groupe lié aux échantillons Solvay, ainsi qu'un dernier groupe regroupant les échantillons contenus dans l'eau distillée, l'eau de rivière, les lixiviats de Boue et de Sédiment. Du fait de la présence de ces regroupements, il a été émis l'hypothèse que les régulations transcriptomiques liées à la nature de l'échantillon peuvent influer, voire masquer les réponses liées à la contamination métallique.

Afin de vérifier cette hypothèse, des analyses statistiques dédiées à l'établissement de profils transcriptomiques ont été réalisées. Ceci permet de mettre en place des profils de réponse représentatifs de chaque groupe d'échantillons puis de réaliser une prédiction de classe sur la base de la connaissance du groupe d'appartenance de chacun des échantillons. Autrement dit, il s'agit de pouvoir discriminer et d'identifier le groupe d'appartenance d'un échantillon sur la base des similarités de leurs régulations transcriptomiques.

2.5. Etablissement de profils transcriptomiques

2.5.1. Méthodologie pour l'établissement des profils transcriptomiques

Les profils transcriptomiques sont établis suite à la réalisation d'analyses chimiométriques, c'est-àdire une Analyse en Composantes Principales (ACP) suivie d'une Analyse Factorielle Discriminante (AFD). En effet, l'ACP est une méthode descriptive qui permet de résumer l'ensemble des données. Le calcul d'une ou de plusieurs fonctions discriminantes à partir des résultats de l'ACP permet l'obtention d'un modèle de classification des groupes. On détermine ainsi le poids des variables les plus discriminantes en regardant leur contribution individuelle dans le modèle (Figure 52). Sur la base des variables discriminantes, les profils de réponse ont été établis. Un transcrit est dit spécifique d'un groupe lorsque qu'au moins deux échantillons appartenant à ce groupe régulent ce même transcrit de manière identique (activation ou répression).



Figure 52 : Intérêt du couplage des méthodes d'ACP et d'AFD

2.5.2. Profils de réponse liés à la nature des échantillons

Sur la base de recoupement de transcrits, les profils de réponse pour les groupes d'échantillons différenciés selon leur nature sont établis. Les résultats sont visibles dans le Tableau 37.

| Matrice | Rivière (5) | Terre (6) | Bois (6) | Solvay (4) |
|------------|-------------|-----------|----------|------------|
| Activation | 12 | 4 | 2 | 0 |
| Répression | 31 | 114 | 137 | 57 |

Tableau 37 : Profils transcriptomiques relatifs à la nature des échantillons

Entre parenthèse est figuré le nombre d'échantillons par groupe.

Ces profils de réponse ont ensuite été comparés entre eux. Les groupes sont distincts, traduisant le fait que chaque profil est bien spécifique de la nature de l'échantillon. Une exception est cependant visible pour le profil lié à l'eau de rivière (R), pour lequel on retrouve de fortes corrélations avec le groupe métaux dans l'Eau distillée (E). Sur l'ACP, il est à noter que le taux de représentativité de l'information sur les trois premières composantes n'est pas très élevé (36,9%). Ceci s'explique par le fait qu'il y ait peu de variablité dans l'ensemble des données et que cette variabilité ne se concentre pas dans une direction multivariée privilégiée (Figure 53).





(A) Représentation de l'ACP selon les différents profils. Les différents échantillons sont représentés selon leur matrice : Eau distillée (bleu), eau de Rivière (cyan), Sédiment (bleu ciel), Boue (gris), Terre (marron), Bois (vert) ou Solvay (violet). Etude réalisée en présence de n=43 échantillons. Représentation des trois composantes principales possédant le pourcentage de variance les plus élevés. Les ellipses ont un but visuel et n'ont aucune valeur statistique. CP : Composante Principale. (B) Loadings de l'ACP représentant la séparation des variables.

Suite à cette analyse descriptive par ACP, une AFD a été ensuite réalisée afin de valider et de définir la robustesse des profils. Les résultats de cette analyse sont visibles sur la Figure 54.



Figure 54 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur matrice Etude réalisée en présence de n=43 échantillons.

Les échantillons de Bois et de Terre sont classés correctement selon un taux de 100% et 90%, soit 6/6 et 5/6 échantillons respectivement. Les profils caractéristiques de la nature de l'échantillon sont donc validés. Cependant, les deux profils liés aux échantillons Rivière et Solvay sont un peu moins robustes, avec des taux de bonne classification des échantillons de 73% et 77% respectivement (soit 4/5 et 3/4 échantillons bien classés). Ce résultat peut s'expliquer par le nombre de transcrits composant le profil. Alors que les deux profils Bois et Terre sont composés de plus d'une centaine de descripteurs chacun, les deux autres profils Rivière et Solvay ne comptabilisent que 43 et 57 transcrits respectivement. Ce nombre plus faible de descripteurs conduit alors à une classification moins fiable des échantillons.

Il est intéressant de se questionner quant à la raison du faible nombre de descripteurs de ces deux types d'échantillon.

La première hypothèse est biologique et est basée sur le fait que ces deux matrices ont peu d'impact sur les régulations transcriptomiques, leurs effets pouvant se rapprocher de ceux de l'eau distillée. Ceci est conforté par le fait que 26% et 21% des échantillons d'eau de Rivière et de Solvay respectivement sont classés avec le groupe Eau (résultats non présentés).

La seconde hypothèse avancée est mathématique et est basée sur la méthodologie de la mise en place des profils à proprement parler. En effet, un transcrit est considéré comme représentatif de la

matrice si au moins deux échantillons le régulent de manière identique. Or, les échantillons en eau de rivière et les échantillons Solvay sont au nombre de 5 et de 4 respectivement. En comparaison aux échantillons de Terre et de Bois qui comportent chacun 6 échantillons, le nombre de transcrits représentatifs est plus restreint. Ainsi, il peut être intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons Rivière et Solvay afin de voir l'évolution de la spécificité de leurs profils de réponse.

Cependant, malgré certains taux plus faibles de classification correcte, les profils établis permettent de distinguer une matrice environnementale d'une matrice Eau. En effet, le très bon de classification des échantillons contenus en Eau distillée (98%) nous laisse penser que ces derniers ne se rapprochent pas des quatre autres profils environnementaux. Ainsi, par la mise en place de profils transcriptomiques, il est possible d'adopter une analyse discriminante pour la classification des échantillons selon la nature de leur matrice.

Après avoir défini les transcrits spécifiques des différentes matrices, la suite des travaux a porté sur la caractérisation des échantillons contenant des contaminations métalliques. Dans la partie suivante sera abordée la mise en place d'un profil qualitatif représentatif de la présence de métal.

2.5.3. Profil qualitatif lié à la présence de métal

2.5.3.1. Etablissement du profil sur les échantillons connus de laboratoire

Dans un premier temps, le profil Présence de métal a été établi sur la base de l'ensemble des échantillons de laboratoire contenant des métaux (18 échantillons métaux dans l'Eau distillée). Le profil ainsi établi se compose de 175 transcrits, dont 62 en activation et 113 en répression. Selon l'annotation *Gene Ontology*, en réponse aux métaux, on observe l'activation de la transcription (17%), ainsi que du métabolisme du fer (6%). De même, on observe la répression des transporteurs de protons (5%) ainsi que ceux des nucléosides cytidine et uridine (2%). L'ensemble de ces transcrits sont référencés dans les Tableaux A et B en annexe en fin de ce chapitre.

2.5.3.2. Application du profil sur les échantillons environnementaux

Suite à l'établissement du profil Présence de métaux sur les 18 échantillons de métal dans l'eau distillée, celui-ci a ensuite été appliqué sur l'ensemble des échantillons, c'est-à-dire en incluant les échantillons environnementaux. Sur la base de la connaissance de la présence ou de l'absence de métaux, la bonne classification des échantillons selon leur contamination validera ou non le profil transcriptomique mis en place. Pour rappel, le critère Présence ou Absence de métaux dans le cas des échantillons environnementaux est défini selon les résultats obtenus par les bioéléments

bactériens (cf. Chapitre 3, paragraphe 2.3 et Tableau 32). L'ensemble des échantillons ont été analysés selon une ACP puis une AFD. Les résultats sont représentés sur la Figure 55 et la Figure 56 respectivement.



Figure 55 : Représentation de l'ACP selon le profil Présence de métal, indépendamment des profils liés à la nature de l'échantillon

(A) Les différents échantillons sont représentés selon leur contamination en métaux : Absence (violet) ou Présence (cyan). Etude réalisée en présence des 43 échantillons. Représentation des trois composantes principales possédant le pourcentage de variance les plus élevés. CP : Composante Principale. (B) Loadings L de l'ACP représentant la séparation des variables.



Figure 56 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur absence ou présence de métal, indépendamment des profils liés à la nature de l'échantillon

Etude réalisée en présence des 43 échantillons.

L'AFD classe correctement les échantillons dans les groupes Absence et Présence de métaux selon un taux de 87% et 84% respectivement (soit 17/19 et 20/24 échantillons bien classés). Du fait de ces bons taux de classification correcte, les résultats de l'analyse par bioélément bactérien et de l'analyse transcriptomique sont concordants, validant de ce fait le profil Présence de métaux établi. De plus, il est intéressant de noter que parmi les échantillons étudiés, certains sont contaminés par un seul métal, tandis que d'autres possèdent de multiples contaminations. Ainsi, le profil établi est suffisamment performant pour définir la présence ou non de métal, même en présence d'un mélange de métaux.

La seconde question relative à l'étude d'échantillons environnementaux concerne l'effet lié à la matrice. En effet, comme précédemment montré dans la partie précédente, la matrice possède un profil spécifique. Il s'agit alors de savoir quel est l'impact de celle-ci sur le profil transcriptomique, c'est-à-dire définir dans quelle mesure celle-ci impacte le profil lié à la présence de métaux. Pour répondre à ces questions, l'ensemble des transcrits composant les profils liés aux différentes matrices ont été masqués, c'est-à-dire que l'on observe les réponses transcriptomiques en s'exemptant de l'effet matrice. Les résultats sont affichés dans la Figure 58.



Figure 57 : Représentation de l'ACP selon le profil Présence de métal, en tenant compte des variables liées à la nature de l'échantillon

(A) Les différents échantillons sont représentés selon leur contamination en métaux : Absence (violet) ou Présence (cyan). Etude réalisée en présence de n=43 échantillons. Représentation des trois composantes principales possédant le pourcentage de variance les plus élevés. CP : Composante Principale. (B) Loadings L de l'ACP représentant la séparation des variables.



Figure 58 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur absence ou présence de métal en tenant compte des transcrits liés à la nature de l'échantillon Etude réalisée en présence de n=43 échantillons.

Les résultats d'AFD en s'affranchissant des effets liés aux différentes matrices conduisent à des taux de classification correcte de 81 et de 87% (soit 15/19 et 21/24 échantillons bien classés) pour les deux groupes Absence et Présence de métaux respectivement. Du fait que ces résultats soient très proches de ceux obtenus en ne s'affranchissant pas de la matrice, les différents profils liés à la matrice n'impactent pas celui relatif à la Présence de métal, les effets de matrice n'interfèrent pas sur la détection des métaux. Ainsi, le profil lié à la Présence de métaux, et ce, quelque soit la nature de l'échantillon. Ce résultat s'explique par le fait que les profils relatifs à la Présence des métaux ainsi que ceux caractéristiques des différentes matrices ne se recoupent pas. En effet, comme représenté sur la Figure 59, chacun des profils établis est bien spécifique du groupe qu'il représente. De ce fait, il n'est pas nécessaire de caractériser au préalable la matrice avant cette analyse. Ainsi, il est important de souligner le fait que cette caractérisation peut être intéressante et informative, mais n'est pas requise pour répondre à la question de la présence ou non de métaux.



Figure 59 : Profils de réponse transcriptomiques liés à la présence de métaux et aux différentes matrices En rouge apparaissent les transcrits activés, en vert les transcrits non exprimés et en bleu, les transcrits réprimés.

Ainsi, la collection réduite de 175 transcrits composant le profil Présence de métaux est suffisante pour caractériser la présence de métaux. Initialement composée de 1 810 gènes uniques, cette collection restreinte de 175 souches permet d'accéder rapidement à l'information liée à la présence de métal. En effet, via l'élimination de près de 90% des gènes non informatifs par rapport à la question posée, le travail réalisé, à la fois expérimental et analytique s'en retrouve fortement allégé. Dans la suite des études, l'ensemble des problématiques liées à la présence de métaux seront abordées à partir de ce profil de réponse, c'est-à-dire que seuls les 175 transcrits spécifiques à la présence de métaux seront analysés. Dans le paragraphe suivant, les travaux ont porté sur la mise en place de profils de réponse liés à la concentration métallique.

2.5.4. Profil lié à la concentration de métal

Le but de cette partie est d'établir des profils de réponse spécifiques à chacune des concentrations métalliques et plus globalement, aux effets toxiques associés à ces concentrations. Pour se faire, sur la base du profil Présence de métaux précédemment établi, des profils relatifs aux trois concentrations utilisées ont été recherchés. Pour rappel, les trois concentrations utilisées dans le cadre de cette étude sont la concentration C1 non toxique, la concentration C2 correspondant à la plus haute concentration n'entrainant pas d'effets toxiques, ainsi que la concentration C3 conduisant à une inhibition de 25% de la croissance. Les résultats de l'ACP et de l'AFD sont observables sur la Figure 60 et la Figure 61 respectivement.



Figure 60 : Représentation de l'ACP selon le profil Concentration des métaux

(A) Les différents échantillons sont représentés selon leur concentration en métaux : concentration C1 (vert), concentration C2 (orange), concentration C3 (rouge). Etude réalisée en présence de n=18 échantillons métaux dans l'Eau distillée. Représentation des trois composantes principales possédant le pourcentage de variance les plus élevés. CP : Composante Principale. (B) Loadings L de l'ACP représentant la séparation des variables.



■ Concentration C1 (n=6) ■ Concentration C2 (n=6) ■ Concentration C3 (n=6)

Figure 61 : Taux de classification des échantillons en fonction de leur concentration en métal Etude réalisée en présence de n=18 échantillons métaux dans l'Eau distillée.

Sur la représentation de l'ACP, les groupes correspondant aux trois concentrations ne sont pas visuellement dissociables. Cependant, suite à l'AFD, on peut constater que la classification dans chacun des groupes C1, C2 ou C3 est robuste et atteint des taux de bonne classification de 100%, de 98% et de 97% respectivement. Sur la base des 175 transcrits étudiés, l'AFD permet la distinction entre les trois concentrations appliquées. On observe ainsi la présence de profils spécifiques pour

chacune des concentrations de métaux, traduisant le fait que des régulations différentes se produisent pour chaque niveau de toxicité. Le nombre de transcrits spécifiques et régulés pour chacune des concentrations est noté dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Régulation des transcrits spécifiques des concentrations C1, C2 et C3

| Régulation | Concentration C1 | Concentration C2 | Concentration C3 |
|------------|------------------|------------------|------------------|
| Activation | 6 | 15 | 17 |
| Répression | 7 | 28 | 26 |

Etude réalisée en présence des 18 échantillons métaux dans l'Eau distillée.

2.5.5. Profil lié à la nature du métal

La dernière analyse a porté sur l'identification de la nature du métal à partir du profil de 175 transcrits. Le but de cette analyse est d'identifier le métal sur la base des régulations transcriptomiques engendrées suite à une exposition. Pour rappel, les métaux étudiés sont au nombre de six, à hauteur de trois concentrations par métal. Ainsi, du fait du très faible nombre d'échantillons inclus dans chaque groupe et des importants taux d'erreur, les résultats présentés ici ne constituent qu'un premier essai réalisé pour l'identification des métaux selon leur nature, les observations et résultats ne doivent en aucun cas être considérés comme validés.

Les résultats concernant la dispersion des échantillons et leur classement selon le métal impliqué sont représentés sur la Figure 62 et la Figure 63 respectivement.



Figure 62 : Représentation de l'ACP selon le profil Nature des métaux

Les différents échantillons sont représentés selon leur nature en métaux : arsenic (orange), cadmium (rouge), cuivre (bleu), mercure (vert), plomb (violet) et zinc (beige). Etude réalisée en présence de n=18 échantillons métaux dans l'Eau distillée. Représentation des trois composantes principales possédant le pourcentage de variance les plus élevés. CP : Composante Principale. (B) Loadings L de l'ACP représentant la séparation des variables.



[■] Arsenic (n=3) ■ Cadmium (n=3) ■ Cuivre (n=3) ■ Mercure (n=3) ■ Plomb (n=3) ■ Zinc (n=3)

Les résultats de l'AFD nous indiquent que les taux de classification correcte des six métaux sont proches de 80%. Avec trois échantillons par groupe, ceci implique que dans 2 cas sur 3, l'échantillon

Figure 63 : Taux de classification des échantillons en fonction de la nature du métal Etude réalisée en présence de n=18 échantillons métaux dans l'Eau distillée.

est bien classé. Ce résultat est encourageant, mais afin de le valider, il est nécessaire de réaliser des essais supplémentaires. Dans cette future étude, ces travaux seront allégés du fait qu'il ne s'agira que d'étudier la réponse aux 175 transcrits représentatifs du profil lié à la présence de métaux.

2.6. Etablissement de profils sur la base de recoupements fonctionnels

Suite à l'établissement de profils transcriptomiques, nous nous sommes intéressés à un autre niveau métabolique, c'est-à-dire aux fonctions des gènes. En effet, jusqu'à présent, les profils ont été établis sur la base de recoupements transcriptomiques. Le but de cette partie est alors de savoir si, sur la base des régulations fonctionnelles, cette même analyse discriminatoire peut être établie. Pour cela, l'intégralité des 1 810 transcrits ont été décrits selon leurs fonctions et regroupés selon des annotations fonctionnelles (banque de données *Gene Ontology*). Ce travail a été réalisé en présence des 43 échantillons, mais seuls les échantillons contenus en eau distillée (E), les lixiviats de Terre (T) et les lixiviats de Bois (B) ont été représentés ici (Tableau 39).

Tout d'abord, de nombreux échantillons ne sont pas décrits selon cette base de données fonctionnelle. Ceci peut s'expliquer par le nombre de transcrits régulés par échantillon parfois faible, en plus du manque d'informations de la littérature. Ensuite, pour l'ensemble des conditions testées, aucun profil de régulation organisé ne semble émerger. En effet, certaines annotations sont spécifiques à un échantillon, telles que la répression des processus cataboliques de l'arabinose en présence de l'échantillon E-C3-Ars ou encore la répression de la mobilité flagellaire en réponse à l'exposition a l'échantillon B-BC4. D'autres annotations sont partagées au sein des différentes matrices. C'est le cas de la répression de la chimiotaxie en présence des deux échantillons E-C1-Pbr et B-BC4, ou encore de la répression du métabolisme du carbone pour les échantillons T-Neobab1, B-020 et B-BC2. On observe de plus que certaines réponses sont activées pour des échantillons et réprimées pour d'autres. C'est le cas notamment du transport des acides aminés dont le sens de régulation diffère selon la condition E-C2-Ars et E-C2-Pbr. Enfin, certaines annotations sont régulées pour de nombreux échantillons, indépendamment de leur matrice. C'est le cas par exemple de la régulation de la transcription. Ainsi, il n'existe pas de profils de régulation organisé au sein des différents échantillons partageant une matrice commune, il est alors impossible de prévoir l'appartenance d'un échantillon à un cluster sur la base de ses annotations fonctionnelles. Ceci nous montre alors que chaque échantillon possède un mécanisme de réponse spécifique lié à la contamination de celui-ci.

Tableau 39 : Processus biologiques régulés pour les métaux dans l'Eau, les lixiviats de Terre ou les lixiviats de Bois

| | | Métaux dans de l'eau distillée | Lixiviats de Terre Lixiviats de Bois | | | Lixiviats de Bois | | |
|-------------|---|----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------|---|-------------------------------------------------|
| Echantillon | | Fonction | Echantillon | Echantillon Fonction F | | Echantillon | | Fonction |
| E C1 Arc | + | response to oxidative stress | | + | | | + | |
| (8/5) | - | | T-Témoin1 (9/63) | - | negative regulation of transcription, DNA templated | | | one carbon metabolic process |
| E-C1-Cop | + | | | | zinc II ion transport | B-020 | | enzyme directed rRNA pseudouridine synthesis |
| (16/11) | - | | T Indoor1 | + | | (4/154) | - | cellular response to DNA damage stimulus |
| E-C1-Mer | + | protein homotetramerization | (7/47) | | transcription, DNA templated | | | tetrahydrofolate biosynthetic process |
| (8/22) | - | | (//4/) | - | zinc II ion transmembrane transport | | | cellular response to reactive oxygen species |
| E-C1-Cad | + | | | + | transcription, DNA templated | | | proton transport |
| (3/11) | - | | | | one carbon metabolic process | | + | |
| E-C1-Znt | + | | | | tetrahydrofolate biosynthetic process | | | lipoate biosynthetic process |
| (3/7) | - | | T-Neobab1 | | regulation of transcription | B 051 | | protein lipoylation |
| E C1 Dbr | + | | (3/83) | - | ubiquinone biosynthetic process | D-USI (7/102) | | dephosphorylation |
| (3/7) | | chomotovic | | | zine II ion transmombrano transport | (7/102) | - | glycine decarboxylation via glycine cleavage |
| (3/7) | _ | chemotaxis | | | | | | system |
| E-C2-Ars | + | amino acid transmembrane transport | | | tRNA modification | | | coenzyme A biosynthetic process |
| (9/14) | - | | | + | | | + | |
| | | positive regulation of gene expression | T-Témoin2 | | potassium ion transport | B-BR1 | | ubiquinone biosynthetic process |
| E-C2-Cop | + | spermidine biosynthetic process | (6/69) | - | transcription, DNA templated | (17/99) | - | response to osmotic stress |
| (37/16) | | transcription | | | protein homotetramerization | | | cellular response to DNA damage stimulus |
| | - | | | + | | | + | |
| E C2 Mor | + | | | | cell wall organization | | | deoxyribonucleotide catabolic process |
| (17/16) | | proton transport | T Indoor2 | | pentidoglycan catabolic process | P PC4 | | negative regulation of bacterial type flagellum |
| (17/10) | | | (11/101) | _ | | 6-6C4 (15/79) | | dependent cell motility |
| E-C2-Cad | + | iron assimilation | (11/101) | _ | protein homotetramerization | (13/73) | | chemotaxis |
| (20/49) | - | amino acid transmembrane transport | | | glucose import into cell | | | positive regulation of translation |
| E-C2-Znt | + | | | | cobalt ion transport | | | nucleotide phosphorylation |
| (9/25) | - | | | + | | | + | cell adhesion |
| | + | | T-Neobab2 | | proton transport | | | dephosphorylation |
| F-C2-Phr | | proton transport | (10/119) | - | protein homotetramerization | B-CCA2 | | dUMP biosynthetic process |
| (11/20) | - | uridine transport | (| | negative regulation of transcription, DNA templated | (10/67) | - | hyperosmotic response |
| | | cytidine transport | | | | | | positive regulation of translation |

Tableau 39 : Processus biologiques régulés pour les métaux dans l'Eau, les lixiviats de Terre ou les lixiviats de Bois (suite)

Métaux dans de l'eau distillée

| Echantillon | Fonction | | | |
|-------------|----------|-----------------------------------------------------------|--|--|
| E-C2-Arc | + | | | |
| (11/16) | - | L-arabinose catabolic process to xylulose 5- phosphate | | |
| | | iron assimilation | | |
| 5 69 6 | | transcription, DNA templated | | |
| E-C3-Cop | + | response to ionizing radiation | | |
| (59/27) | | response to copper ion | | |
| | - | | | |
| E-C3-Mer | + | | | |
| (12/19) | - | | | |
| E-C3-Cad | + | | | |
| (14/24) | - | | | |
| E-C3-Znt | + | | | |
| | | proton transport | | |
| (0/42) | - | transmembrane transport | | |
| E C2 Dhr | | response to zinc ion cell | | |
| (11/58) | + | redox homeostasis | | |
| (11/30) | - | proton transport | | |
| | + | deoxyribonucleotide biosynthetic process | | |
| | | cytidine transport | | |
| (17/60) | | uridine transport | | |
| (17/00) | - | proton transport | | |
| | | transcription, DNA templated | | |

| Echantillon | | Fonction |
|--------------------------|---|-----------------------------------------|
| | + | |
| B-BC2 (15/174) | | zinc II ion transmembrane transport |
| | | one-carbon metabolic process |
| | | glutathione metabolic process |
| | - | calcium ion transmembrane transport |
| | | cellular calcium ion homeostasis |
| | | phosphorelay signal transduction system |
| | | regulation of transcription |

+ : Activation, - : Répression. Entre parenthèses sont notés le nombre de transcrits régulés pour chaque échantillon (activation/répression). Résultats issus de la classification *Biological Process* selon *Gene Ontology*.

Annotations uniques, annotations présentes sur différentes matrices, fonctions dont la régulation diffère selon l'échantillon, annotations globales indépendantes de la nature de l'échantillon.

3. Conclusion

Ce chapitre a eu pour objectif la mise en place des bases méthodologiques pour la réalisation du traitement de données des souches bactériennes fluorescentes. Dans un premier temps, la mise en place d'une méthode de traitement des données transcriptomiques a été réalisée puis validée sur des échantillons connus de laboratoire. Dans un second temps, cette méthode a été appliquée sur des échantillons environnementaux dans le but de les caractériser. Par la mise en place de profils transcriptomiques spécifiques, il est désormais possible de déterminer la présence de métaux ainsi que d'en caractériser les effets toxiques associés.

Tout d'abord, lors de l'étude des paramètres biologiques relatifs aux souches bactériennes, des variabilités de réponse en fluorescence et en absorbance ont été observées. Les variations de fluorescence sont liées aux souches bactériennese aux variabilités propres aux échantillons. Pour l'absorbance, les variations sont dues à la coloration naturelle des échantillons et/ou à leur richesse en matières organiques, ces dernières favorisant le développement de la biomasse bactérienne. La méthode d'analyse mise en place a été établie de manière à minimiser les variabilités expérimentales et omettre les effets non biologiques. De ce fait, elle répond à plusieurs critères, à savoir *(i)* la normalisation de la fluorescence par rapport à la densité bactérienne, *(ii)* la normalisation des réponses sur l'ensemble de la collection (normalisation intra et inter-plaques) pour *(iii)* les gènes qui sont exprimés uniquement. Cette méthode a ensuite été validée par la concordance des réponses transcriptomiques entre les résultats issus de cette étude avec données de la littérature.

Dans la seconde partie du chapitre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la contamination métallique au sein d'échantillons environnementaux. Dans ce contexte, la question de l'importance et de l'influence de la matrice environnementale sur la réponse transcriptomique a été étudiée. Pour cela, les différentes matrices environnementales ont été caractérisées. Les profils relatifs à la nature des échantillons d'eau de Rivière, de Terre, de Bois et des échantillons Solvay ne se recoupent pas entre eux. Le profil lié à la Présence des métaux a lui aussi établi et se compose de 175 transcrits. Ainsi, l'existence d'un profil transcriptomique propre à chaque groupe d'échantillons (selon la matrice ou selon la présence de métaux) démontre le fait que les différences et les particularités de chacun des environnements peuvent être mises en évidence par l'étude de la régulation des transcrits.

La bonne classification des échantillons (environ 85%) selon l'absence ou la présence de métaux montre la fiabilité du profil transcriptomique établi. De plus, l'obtention de résultats proches entre

les deux conditions en s'exemptant ou non des transcrits relatifs à la nature de l'échantillon démontre le fait que la matrice n'influence pas l'issue de la réponse liée à la question de la présence de métaux. Ainsi, la caractérisation transcriptomique des matrices n'est pas nécessaire en prétraitement analytique et ne possède qu'une valeur descriptive. Ceci constitue un résultat important, ouvrant la possibilité d'appliquer la méthodologie d'évaluation de la présence de métal à n'importe quel échantillon, indépendamment de sa matrice environnementale. Alors que les études réalisées jusqu'à présent n'étaient principalement réalisées qu'en présence d'échantillons de laboratoire dans de l'eau distillée (Elad and Belkin 2013), cette étude constitue une des premières études appliquées sur des échantillons environnementaux divers. Enfin, les échantillons contenant des métaux ont été correctement classés, que ceux-ci soient présents en simple contamination, ou au contraire, en mélanges de métaux. Ce résultat démontre la robustesse du profil établi en plus de l'existence d'un profil de régulation commun lorsque les métaux sont présents en mélange.

Les travaux réalisés ici permettent, en plus de caractériser la présence de métaux au sein d'échantillons environnementaux inconnus, d'évaluer le niveau de toxicité associé à la présence de ces métaux. En effet, l'établissement d'un profil Concentration des métaux permet de définir le niveau de toxicité d'un échantillon et de distinguer un échantillon non toxique, un échantillon à la limite de la toxicité et un échantillon toxique. Enfin, la distinction selon le métal impliqué a été étudiée, mais malgré des résultats encourageants, ces résultats restent à confirmer du fait que l'analyse ait été réalisée sur un très faible nombre d'échantillons (n=3). Dans la suite des études, il est envisagé de valider cette réponse par la réalisation d'expériences supplémentaires impliquant l'augmentation du nombre d'échantillons.

Ainsi, la méthodologie développée par l'utilisation des souches fluorescentes présente de nombreux avantages. Dans le cas de ces travaux, nous nous sommes intéressés à la contamination d'échantillons environnementaux par les métaux. Pour répondre à cette problématique, l'interrogation de 175 souches (2 microplaques) contre les 1 810 souches composant initialement la collection (21 microplaques) est suffisante. Cette réduction de 90% du nombre de souches étudiées permet d'alléger largement le travail à réaliser, du point de vue expérimental et analytique, dans le traitement de données. De plus, le système utilisant les souches fluorescentes est un système ouvert. Ceci signifie que le nombre et la nature des échantillons ne sont pas limitants, les profils établis ne sont pas figés et peuvent être modulés selon le type de contamination et le nombre d'échantillons par exemple.

4. Annexes

Liste des annexes :

Tableau A : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Activation

Tableau B : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Répression

Tableau A : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Activation

| Nom | Fonction |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ydcA | putative periplasmic protein(ydcA) |
| gudP | putative D-glucarate transporter(gudP) |
| yihR | putative sulphoquinovose mutarotase(yihR) |
| yhbQ | GIY-YIG nuclease superfamily protein(yhbQ) |
| yraQ | putative inner membrane permease(yraQ) |
| ycjW | Lacl family putative transcriptional repressor(ycjW) |
| osmB | osmotically and stress inducible lipoprotein(osmB) |
| yncE | ATP-binding protein, periplasmic, function unknown(yncE) |
| усаК | putative NAD(P)H-dependent oxidoreductase(ycaK) |
| ynfC | UPF0257 family lipoprotein(ynfC) |
| argA | amino acid N-acetyltransferase and inactive acetylglutamate kinase(argA) |
| yqiJ | DUF1449 family inner membrane protein(yqiJ) |
| cirA | colicin IA outer membrane receptor and translocator; ferric iron-catecholate transporter(cirA) |
| grxA | glutaredoxin 1, redox coenzyme for ribonucleotide reductase (RNR1a)(grxA) |
| sodA | superoxide dismutase, Mn(sodA) |
| | quorum sensing DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with |
| qseB | QseC(qseB) |
| mutH | methyl-directed mismatch repair protein(mutH) |
| yajR | putative transporter(yajR) |
| yqjH | putative siderophore interacting protein(yqjH) |
| yfjR | CP4-57 prophage; putative DNA-binding transcriptional regulator(yfjR) |
| fpr | ferredoxin-NADP reductase; flavodoxin reductase(fpr) |
| fhuF | ferric iron reductase involved in ferric hydroximate transport(fhuF) |
| yedW | response regulator family protein(yedW) |
| | bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/ 5,10-methylene-tetrahydrofolate |
| folD | cyclohydrolase(folD) |
| pmbA | putative antibiotic peptide MccB17 maturation peptidase(pmbA) |
| mraZ | RsmH methytransferase inhibitor(mraZ) |
| ais | putative LPS core heptose(II)-phosphate phosphatase(ais) |
| znuA | zinc ABC transporter periplasmic binding protein(znuA) |
| znuC | zinc ABC transporter ATPase(znuC) |
| yjhF | putative transporter(yjhF) |
| amiA | N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase I(amiA) |
| yhfL | small lipoprotein(yhfL) |
| fhuA | ferrichrome outer membrane transporter(fhuA) |
| speC | ornithine decarboxylase, constitutive(speC) |
| htpX | putative endopeptidase(htpX) |
| yadK | putative fimbrial-like adhesin protein(yadK) |
| yhiJ | DUF4049 family protein(yhiJ) |
| yffS | CPZ-55 prophage; uncharacterized protein(yffS) |
| nanR | sialic acid-inducible nan operon repressor(nanR) |
| ssuE | NAD(P)H-dependent FMN reductase(ssuE) |
| ecpD | polymerized tip adhesin of ECP fibers(ecpD) |

| Nom | Fonction |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| lacA | thiogalactoside acetyltransferase(lacA) |
| otsB | trehalose-6-phosphate phosphatase, biosynthetic(otsB) |
| glxK | glycerate kinase II(glxK) |
| fes | enterobactin/ferrienterobactin esterase(fes) |
| pqiA | paraquat-inducible, SoxRS-regulated inner membrane protein(pqiA) |
| rrlB | 23S ribosomal RNA of rrnB operon(rrlB) |
| yijO | AraC family putative transcriptional activator(yijO) |
| | aminomethyltransferase, tetrahydrofolate-dependent, subunit (T protein) of glycine cleavage |
| gcvT | complex(gcvT) |
| aldB | aldehyde dehydrogenase B(aldB) |
| ybhD | putative DNA-binding transcriptional regulator(ybhD) |
| yhcG | DUF1016 family protein in the PD-(D/E)XK nuclease superfamily(yhcG) |
| cspl | Qin prophage; cold shock protein(cspl) |
| ybcK | DLP12 prophage; putative recombinase(ybcK) |
| dpbA | unknown function |
| b0257 | unknown function |
| tdcG_2 | unknown function |
| b0165 | unknown function |
| b0582 | unknown function |
| b2680 | unknown function |

Tableau A : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Activation (suite)

Issu de David bioinformatics.

| Nom | Fonction |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| yqeG | putative transporter(yqeG) |
| hcaT | putative 3-phenylpropionic transporter(hcaT) |
| rpIL | 50S ribosomal subunit protein L7/L12(rplL) |
| glnU | tRNA(glnU) |
| ydcJ | putative metalloenzyme(ydcJ) |
| yneE | bestrophin family putative inner membrane protein(yneE) |
| sapA | antimicrobial peptide transport ABC transporter periplasmic binding protein(sapA) |
| ymjA | DUF2543 family protein(ymjA) |
| focA | formate channel(focA) |
| уеаМ | putative DNA-binding transcriptional regulator(yeaM) |
| усаС | putative isochorismatase family hydrolase(ycaC) |
| ribE | riboflavin synthase beta chain(ribE) |
| yail | UPF0178 family protein(yail) |
| elaB | putative membrane-anchored DUF883 family ribosome-binding protein(elaB) |
| ynfK | putative dethiobiotin synthetase(ynfK) |
| fliL | flagellar biosynthesis protein(fliL) |
| ynfL | LysR family putative transcriptional regulator(ynfL) |
| gmr | cyclic-di-GMP phosphodiesterase; csgD regulator; modulator of RNase II stability(gmr) |
| yhcO | putative barnase inhibitor(yhcO) |
| pstC | phosphate ABC transporter permease(pstC) |
| ycaN | LysR family putative transcriptional regulator(ycaN) |
| | O-acetyl-ADP-ribose deacetylase; RNase III inhibitor during cold shock; putative cardiolipin |
| ymdB | synthase C regulatory subunit(ymdB) |
| glnL | sensory histidine kinase in two-component regulatory system with GlnG(glnL) |
| kdgR | KDG regulon transcriptional repressor(kdgR) |
| yieE | phosphopantetheinyl transferase superfamily protein(yieE) |
| yddE | PhzC-PhzF family protein(yddE) |
| ubiF | 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol oxygenase(ubiF) |
| hemN | coproporphyrinogen III oxidase, SAM and NAD(P)H dependent, oxygen-independent(hemN) |
| mglB | methyl-galactoside transporter subunit(mglB) |
| adiA | arginine decarboxylase(adiA) |
| cysZ | sulfate transporter, sulfite inhibited(cysZ) |
| ycjG | L-Ala-D/L-Glu epimerase(ycjG) |
| fadL | long-chain fatty acid outer membrane transporter(fadL) |
| yidK | putative transporter(yidK) |
| yncG | glutathione S-transferase homolog(yncG) |
| shiA | shikimate transporter(shiA) |
| ybhM | BAX Inhibitor-1 family inner membrane protein(ybhM) |
| lpxC | UDP-3-O-acyl N-acetylglucosamine deacetylase(IpxC) |
| uhpA | response regulator in two-component regulatory system with UhpB(uhpA) |
| uspE | stress-induced protein(uspE) |
| mscL | mechanosensitive channel protein, high conductance(mscL) |
| rrfE | 5S ribosomal RNA of rrnE operon(rrfE) |

Tableau B : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Répression

| Nom | Fonction |
|------|--------------------------------------------------------------------------------|
| ypjD | cytochrome c assembly protein family inner membrane protein(ypjD) |
| trkA | NAD-binding component of TrK potassium transporter(trkA) |
| hofM | DNA catabolic putative pilus assembly protein(hofM) |
| ycfQ | repressor for bhsA(ycfR)(ycfQ) |
| rbsD | D-ribose pyranase(rbsD) |
| fxsA | suppressor of F exclusion of phage T7(fxsA) |
| ydcI | putative DNA-binding transcriptional regulator(ydcl) |
| mdtG | putative drug efflux system protein(mdtG) |
| yniA | fructosamine kinase family protein(yniA) |
| yddM | putative DNA-binding transcriptional regulator(yddM) |
| yhjJ | putative periplasmic M16 family chaperone(yhjJ) |
| gntT | gluconate transporter, high-affinity GNT I system(gntT) |
| cfa | cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase, SAM-dependent(cfa) |
| таеВ | malic enzyme: putative oxidoreductase/phosphotransacetylase(maeB) |
| blc | outer membrane lipoprotein cell division and growth lipocalin(blc) |
| yebG | DNA damage-inducible protein regulated by LexA(yebG) |
| dksA | transcriptional regulator of rRNA transcription; DnaK suppressor protein(dksA) |
| hyaA | hydrogenase 1, small subunit(hyaA) |
| yqjG | putative S-transferase(yqjG) |
| metJ | transcriptional repressor, S-adenosylmethionine-binding(metJ) |
| ygjH | putative tRNA binding protein; putative tRNA corner chaperone(ygjH) |
| ybiO | mechanosensitive channel protein, intermediate conductance(ybiO) |
| ybjG | undecaprenyl pyrophosphate phosphatase(ybjG) |
| emrE | DLP12 prophage; multidrug resistance protein(emrE) |
| IoIA | lipoprotein chaperone(lolA) |
| yeeR | CP4-44 prophage; putative membrane protein(yeeR) |
| cspD | inhibitor of DNA replication, cold shock protein homolog(cspD) |
| yadG | putative ABC transporter ATPase(yadG) |
| yaiZ | DUF2754 family putative inner membrane protein(yaiZ) |
| ихаС | uronate isomerase(uxaC) |
| uspF | stress-induced protein, ATP-binding protein(uspF) |
| rrID | 23S ribosomal RNA of rrnD operon(rrID) |
| pheP | phenylalanine transporter(pheP) |
| chaC | cation transport regulator(chaC) |
| pitA | phosphate transporter, low-affinity; tellurite importer(pitA) |
| corA | magnesium/nickel/cobalt transporter(corA) |
| murB | UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase, FAD-binding(murB) |
| hisQ | histidine ABC transporter permease(hisQ) |
| nupG | nucleoside transporter(nupG) |
| rrlA | 23S ribosomal RNA of rrnA operon(rrlA) |
| pmrD | inactive two-component system connector protein(pmrD) |
| rssA | putative patatin-like family phospholipase(rssA) |
| yciC | UPF0259 family inner membrane protein(yciC) |

Tableau B : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Répression (suite)

| Nom | Fonction |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|
| codB | cytosine transporter(codB) |
| tonB | membrane spanning protein in TonB-ExbB-ExbD transport complex(tonB) |
| пирС | nucleoside (except guanosine) transporter(nupC) |
| yddW | liprotein, glycosyl hydrolase homolog(yddW) |
| mpaA | murein peptide amidase A(mpaA) |
| yphH | putative DNA-binding transcriptional regulator(yphH) |
| phoP | response regulator in two-component regulatory system with PhoQ(phoP) |
| уасН | DUF3300 family protein(yacH) |
| araD | L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase(araD) |
| yajO | 2-carboxybenzaldehyde reductase(yajO) |
| nanT | sialic acid transporter(nanT) |
| glnH | glutamine transporter subunit(glnH) |
| nanA | N-acetylneuraminate lyase(nanA) |
| yqjC | DUF1090 family putative periplasmic protein(yqjC) |
| murB | unknown function |
| rplL | unknown function |
| b1172 | unknown function |

Tableau B : Transcrits composant le profil Présence de métaux : Répression (suite)

Issu de David bioinformatics.

CHAPITRE 5 :

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux, nous avons mis en place une méthode de détection des métaux et d'évaluation de la toxicité d'échantillons environnementaux vis-à-vis de leur contamination métallique. Pour cela, une méthode basée sur la caractérisation des réactions biologiques via l'analyse de l'expression de promoteurs a été établie. En effet, l'étude des activités promotrices permet de visualiser les effets qu'engendre la présence de contaminants sur les régulations génétiques de la bactérie.

Dans notre étude, deux niveaux d'observation ont été réalisés. Dans un premier temps, la présence de métal a été spécifiquement recherchée. Pour cela, l'expression d'un promoteur inductible en réponse aux métaux est analysée. La production de bioluminescence dose dépendante permet de détecter et de quantifier les concentrations des métaux présents. Dans un second temps, la réponse n'est plus observée au niveau du gène, mais sur l'ensemble des gènes de la bactérie, c'est-à-dire à l'échelle du génome entier. Ceci permet de voir l'ensemble des régulations géniques pour ensuite proposer un profil de réponse global. En comparaison à l'observation au niveau du gène, l'observation à l'échelle du génome permet d'avoir des descripteurs supplémentaires, ce qui permet une meilleure caractérisation de la réponse du contaminant sur la bactérie.

Les résultats de ces travaux se découpent en trois parties. La première partie porte sur la mise en place de méthodes de détection spécifiques au niveau du gène par les bioéléments bactériens. La deuxième partie correspond à l'analyse transcriptomique à l'échelle du génome entier. Enfin, la troisième partie a été consacrée au couplage de ces deux méthodes, dans le but de caractériser complètement un échantillon inconnu du point de vue de sa contamination métallique.

1. Détection spécifique de molécules d'intérêt par bioéléments bactériens

Afin de déterminer si un échantillon contient des métaux, il est possible de détecter et de quantifier spécifiquement la présence de ces molécules. Ceci est notamment développé par les bioéléments bactériens, pour lesquels la production de bioluminescence est corrélée à la concentration de la molécule d'intérêt.

De nombreuses souches détectrices de métaux existent (Corbisier et al. 1993; Ivask et al. 2002; Charrier et al. 2011). Le couplage de ces souches détectrices permet de pallier la faible sensibilité de réponse, en plus de permettre l'identification de la molécule. Par le développement de souches détectrices et de méthodes de traitement de données par arbres de décision, les quatre métaux arsenic, cuivre, mercure et cadmium peuvent être identifiés et semi-quantifiés (Jouanneau et al. 2011). Cependant, dans le but d'étendre le panel de détection, le premier objectif de ces travaux a été de développer des souches détectrices supplémentaires. Trois souches vouées à la détection de chrome, de plomb et d'or ont été construites puis caractérisées. Alors que celles-ci possèdent de multiples détections, le couplage des six souches bactériennes détectrices permet de discriminer la présence de plomb ou de zinc. Cependant, la limitation majeure de la souche *E. coli* pBpbrlux réside dans ses faibles niveaux de bioluminescence. En effet, la faible différence de bioluminescence entre les valeurs minimum et maximum ne permet pas la réalisation d'analyses semi-quantitatives par arbres de décision. Toutefois, cette souche peut être utilisée à des fins qualitatives, via la caractérisation de la présence ou de l'absence de métaux plomb, zinc et cadmium.

Pour la suite des études, il est intéressant d'augmenter les niveaux de bioluminescence émis par cette souche. Pour cela, une des perspectives envisagée est l'intégration de la construction au sein du chromosome bactérien. L'élimination du plasmide en multi-copie, en plus de l'élimination du gène de la résistance à l'antibiotique limiteront la consommation d'énergie liée à l'expression de ces gènes supplémentaires. Par ce biais, les niveaux de bioluminescence peuvent être plus importants, ce qui peut favoriser l'interprétation des données. De plus, il est possible d'augmenter la sensibilité des souches construites, via l'augmentation de la perméabilité des composés dans la bactérie détectrice par exemple (Melamed et al. 2014).

De manière plus générale, il pourrait être intéressant de construire des souches détectrices supplémentaires. Pour se faire, deux méthodes sont envisagées.

- 1) Tout d'abord, il est possible de réaliser de la mutagénèse dirigée sur la base des souches existantes. En effet, dans le cas de la souche *E. coli* pBgollux, il a été montré que la spécificité de détection est due à la protéine GolS. Dans ce cas de figure, une mutagénèse dirigée de la région C-terminale du gène *golS* peut être réalisée dans le but de restreindre la spécificité de la souche aux ions or par exemple. Plus globalement, la région promotrice peut être mutée de sorte à augmenter sa spécificité (Yagur-Kroll et al. 2010). Dans le cas où la protéine responsable de la spécificité de détection n'est pas connue, une mutagénèse aléatoire suivie d'un criblage peuvent aussi être réalisés.
- 2) La seconde possibilité est l'approche qui a été utilisée au cours de ces travaux, c'est-à-dire la construction de souches à partir de données décrites dans la littérature. C'est le cas notamment du nickel, pour lequel les mécanismes de résistance sont décrits (Iwig et al. 2006, 2008). La construction de cette souche peut être intéressante, du fait que sa concentration

dans les eaux est contrôlée (Directive 2000/60/CE). Il est à noter que cette souche est susceptible de ne pas assurer la spécificité de détection au nickel uniquement.

A terme, la construction d'une bactérie contenant plusieurs constructions intégrées au génome est envisagée. Par fusion à des gènes rapporteurs différents (fluorochromes de différentes couleurs par exemple), il serait possible en une simple lecture de déterminer l'activité promotrice de différents promoteurs simultanément. De plus, ceci présente l'avantage de faciliter les conditions expérimentales, via la limitation des souches et des conditions d'induction. Cette bactérie pourrait alors constituer un bioélément multi-détections pour l'identification et la quantification des métaux présents au sein d'un mélange par exemple (Sagi et al. 2003; Hakkila et al. 2003; Hever and Belkin 2006).

Ainsi, au cours de cette partie, nous nous sommes intéressés à la détection spécifique des métaux par bioéléments bactériens. Cette approche a été complétée par une approche plus globale, faisant intervenir l'analyse du transcriptome à l'échelle du génome.

2. Caractérisation globale de la réponse bactérienne par étude transcriptomique

Le deuxième objectif a été de développer une méthode de caractérisation des réponses bactériennes non plus au niveau du gène, mais à l'échelle du génome dans son intégralité. Pour cela, une analyse transcriptomique a été menée via l'utilisation d'une collection de souches fluorescentes. Cette collection composée de 1 810 souches uniques représente plus de 75% des promoteurs connus de la bactérie *E. coli.* Cette collection permet de définir l'expression de l'ensemble des promoteurs de la bactérie, en réponse à une exposition quelquonque.

L'application de la collection de souches fluorescentes a nécessité deux étapes.

Dans un premier temps, la méthode d'analyse a été établie. Le calcul du facteur d'induction, définissant l'expression du promoteur, doit répondre aux deux critères suivants. La méthode d'analyse ne peut être appliquée qu'aux transcrits exprimés, c'est-à-dire aux transcrits qui possèdent une fluorescence supérieure à celle des souches témoin. Ensuite, le calcul du facteur d'induction doit tenir compte de la variabilité à la fois des souches bactériennes (biomasse et fluorescence basale) et des échantillons (fluorescence intrinsèque). Il en résulte un profil de réponse décrit sur l'ensemble de la bactérie avec la présence de transcrits activés, réprimés, ou bien qui possèdent une expression identique à la condition sans inducteur.

Dans un second temps, cette méthode d'analyse a été validée en présence d'échantillons de laboratoire caractérisés (échantillons de métaux en eau distillée). En réponse au cuivre, les réponses transcriptomiques obtenues par puce à ADN ou par la méthode ici développée sont concordantes, validant ce de fait la méthode. Cependant, il pourrait être intéressant d'avoir une méthode de validation supplémentaire, impliquant l'identification et la quantification des transcrits réellement régulés en réponse à l'exposition. Pour cela, les deux méthodes RT-qPCR (*Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*) ou northern blot, permettant la quantification et l'identification et l'identification des ARNm présents dans la cellule, peuvent être réalisées.

Une fois la méthode validée sur des échantillons de laboratoire, cette collection a été utilisée pour caractériser des échantillons environnementaux de matrices différentes (eau de rivière, lixiviats de terre, lixiviats de bois, effluents industriels chimiques). Suite à la lixiviation des échantillons solides et à l'analyse de leurs lixiviats, une première classification de l'ensemble des échantillons environnementaux selon la présence ou l'absence de métal a été établie (profil transcriptomique Présence de métal). Ce profil, en plus d'être valable sur des simples contaminations, permet aussi de discriminer la présence de métaux présents en mélanges. Ensuite, un profil de réponse permettant une classification des échantillons selon le niveau de toxicité associé aux métaux (profil transcriptomique Concentration des métaux) a été établi. Par ce biais, il est possible de distinguer des échantillons non toxiques, des échantillons à la limite de la toxicité, des échantillons présentant une toxicité équivalente à une inhibition de croissance bactérienne de l'ordre de 25%, cette toxicité étant liée à la présence de métal. Enfin, des profils relatifs aux échantillons d'eau de rivière, aux lixiviats de Terre, aux lixiviats de Bois et des échantillons Solvay ont aussi été établis. Ces profils n'interfèrent pas avec le profil lié à la contamination métallique (Présence ou Concentration), ce qui démontre l'applicabilité de ce profil à différents échantillons indépendamment de leurs matrices. Un traitement des données préalable intégrant ces différents profils n'est donc pas nécessaire.

Il est à noter que malgré les faibles concentrations de métal appliquées, la collection de souches fluorescentes est suffisamment sensible pour détecter des modifications dans les régulations transcriptomiques. Cependant, il pourrait être intéressant d'évaluer la sensibilité et les limites de détection de la méthode, c'est à dire la concentration de métal qui n'entraine pas de régulation du transcriptome.

Au cours de l'étude transcriptomique, les mesures ont été réalisées en point final, après 3 heures d'exposition. Cependant, il a été montré que les interactions bactéries/polluants sont dépendantes de la durée de contact (Hamadeh et al. 2002). Il pourrait alors être intéressant de réaliser une étude

temporelle de régulation des gènes, ce qui permettrait d'ajouter une dimension supplémentaire à la réponse de la bactérie au contaminant.

Au cours de cette partie, nous avons mis en place une méthode de caractérisation d'échantillons faisant appel à la réponse transcriptomique à l'échelle du génome. Le troisième objectif a ensuite porté sur le couplage des deux méthodes précédemment développées afin d'avoir une caractérisation complète d'échantillons environnementaux inconnus.

3. Couplage des deux méthodes bactériennes développées

Afin de caractériser la toxicité des échantillons complexes, deux méthodes ont été développées dans les parties précédentes. Cette dernière partie porte ainsi sur la mise en place d'une méthodologie générale couplant ces deux méthodes pour la détection de la présence des métaux, leur quantification, ainsi que la caractérisation du niveau de toxicité associé.

3.1. Description de la méthodologie développée

La méthodologie générale pour l'évaluation de la présence de métaux et de la caractérisation de la toxicité associée est présentée sur la Figure 64.

En présence d'un échantillon inconnu, la première étape consiste à évaluer la toxicité globale de celui-ci, ceci à l'aide de la bactérie bioluminescence constitutive *E. coli* pBtaclux. L'inhibition de bioluminescence de cette bactérie permet de définir le niveau de toxicité de l'échantillon, sans pour autant fournir d'informations sur les molécules responsables de cette toxicité.

Dans le cadre de la détection spécifique des métaux, une étude comparative sur la base de données transcriptomiques est réalisée. Par la comparaison du profil de réponse de l'échantillon inconnu avec le profil Présence de métal, il est possible de définir si celui-ci contient ou non des métaux. Par ce même moyen, il est aussi possible d'évaluer le niveau de contamination lié aux métaux (profil transcriptomique Concentration des métaux).

Pour poursuivre cette caractérisation, la nature des molécules impliquées (arsenic, cuivre, mercure et cadmium) est recherchée. La semi-quantification de la concentration des métaux présents est réalisée par le biais de six souches bioluminescentes détectrices ainsi que les arbres de décision correspondants. De plus, cette approche est informative dans le cas de mélanges, pour lesquels les relations entre les différentes molécules (synergisme ou antagonisme) peuvent être mises en évidence. De plus, cette étape pourra à terme être validée par les analyses transcriptomiques. En

effet, les prochaines études auront pour objectif de valider le profil transcriptomique selon la nature du métal impliqué (cf. Chapitre 4, paragraphe 2.5.5).

La dernière étape du processus est la quantification des métaux mobilisables. Cependant, dans la mesure où les analyses biologiques situées en amont du processus permettent d'identifier voire de semi-quantifier les métaux présents, le dosage systématique et exhaustif des métaux mobilisables par analyse chimique n'est pas nécessaire. Ceci permet la réduction du nombre d'analyses chimiques à réaliser, et *a fortiori*, une réduction des coûts et du temps d'analyse total.



Figure 64 : Principe général de la méthode appliquée pour l'évaluation de la présence et de la toxicité associée à la présence de métaux

Sur la partie gauche de la figure est représentée la méthode, tandis que sur la partie droite sont représentées les moyens biologiques et chimiques utilisés. En encadré cyan sont représentés les bactéries bioluminescentes, en encadré vert les bactéries fluorescentes, et en encadré violet, les méthodes chimiques.

Suite à sa mise en place, cette méthodologie a ensuite été appliquée sur des échantillons environnementaux.
3.2. Caractérisation des échantillons environnementaux

Au cours de cette partie ne vont être abordés que les échantillons environnementaux contenant des métaux, à savoir le lixiviat de l'échantillon de Boue, quatre échantillons provenant d'eau de Rivière et un lixiviat d'un échantillon de Bois (Tableau 32). L'ensemble des données relatives à ces six échantillons sont référencées dans le Tableau 40.

| Paramètre observé | | Ref_Boue | R_C2_Cop | R_C2_Cad | R_Cop_Cad | R_Cad_Cop | B_CCA2 |
|------------------------------------------------|----|------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Toxicité générale (%) | | 72,8 | 51,9 | 99,5 | 99,5 | 95,2 | 73,6 |
| Présence de métaux | | Oui | | | | | |
| Toxicité liée aux métaux | | C2 | C2 | C2 | C3 | C3 | C3 |
| Identification, Semi-quantification (μΜ) | As | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | [2,5 ; 25[|
| | Cu | [25 ; 250[| [50 ; 5000[| Nd | Nd | Nd | [25 ; 250[|
| | Hg | Nd | Nd | Nd | [0,25 ; 250[| [0,25 ; 250[| Nd |
| | Cd | Nd | Nd | [12,5 ; 2500[| [12,5 ; 2500[| [12,5 ; 2500[| [1,25 ; 2500[|
| Dosages chimiques (μM) | As | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nq |
| | Cu | 5 309 | 950 | Nd | 950 | 303 | Nq |
| | Hg | Nd | Nd | Nd | Nd | Nd | Nq |
| | Cd | Nd | Nd | 530 | 800 | 132,5 | Nq |

Tableau 40 : Récapitulatif de l'ensemble des données

La toxicité générale est donnée pour une dilution au 1/2 de l'échantillon. Toxicité liée aux métaux : non toxique (C1), concentration la plus forte n'induisant pas d'effets toxiques (C2), et concentration entrainant 25% d'inhibition de croissance bactérienne (C3). Nd : Non détecté. Nq : Non quantifié. Les échantillons Ref_Boue et B_CCA2 sont étudiés suite à leur lixiviation.

En plus des résultats de chacune des analyses, l'interprétation couplée des résultats des bioéléments bactériens et de l'analyse chimique nous apporte de nombreuses informations supplémentaires. Dans un premier temps, il n'existe pas de corrélation entre la toxicité générale et la toxicité liée aux métaux : une importante toxicité globale n'indique pas que celle-ci est forcément liée aux métaux (échantillon **R_C2_Cad**) et inversement, un échantillon présentant une toxicité globale moyenne peut toutefois contenir de nombreux métaux (échantillon **B_CCA2**). Les six échantillons testés présentent une corrélation entre le nombre de métaux présents et la toxicité associée aux métaux. Dans le cas des échantillons **R_Cop_Cad**, **R_Cad_Cop** et **B_CCA2**, on observe des relations d'interaction entre les métaux qui peuvent expliquer la caractérisation de ces échantillons selon la concentration C3, c'està-dire entrainant une toxicité équivalente à une inhibition de croissance des bactéries de l'ordre de 25%. Enfin, par la comparaison entre les résultats du dosage chimique quantifiant les métaux mobilisables avec les résultats des bioéléments bactériens quantifiant les métaux biodisponibles, il est possible de déterminer la fraction de métaux biodisponibles par rapport aux métaux mobilisables. Ainsi, le couplage des méthodes mises en place au cours de ces travaux a permis la caractérisation d'échantillons divers vis-à-vis de leur contamination aux métaux. Cependant, malgré leurs avantages, ces approches bactériennes présentent des avantages et de limites.

3.3. Avantages et limites des outils bactériens utilisés

3.3.1. Bioélément bactérien

3.3.1.1. Avantages

Tout d'abord, les bactéries sont des organismes facilement modifiables génétiquement. En effet, dès les années 80 ont été décrites les techniques pour le clonage des bactéries (Sambrook et al. 1982). De par l'augmentation exponentielle de la connaissance des génomes bactériens, la construction de nouveaux éléments rapporteurs devient alors très aisée. De nombreux bioéléments rapporteurs de tous types de molécules peuvent alors être construits. En plus des bioéléments destinés à la détection des métaux, il existe de nombreux autres bioéléments dédiés à la détection de molécules organiques comme le toluène et ses composés apparentés (Li et al. 2008), à la détection des antibiotiques (Hansen et al. 2002), ou encore à la détection de bactéries pathogènes au sein de matrices alimentaires (Mello and Kubota 2002).

Les transporteurs métalliques sont nécessaires au maintien de l'homéostasie des métaux essentiels et confèrent la résistance aux ETM non essentiels. Du fait que de nombreux métaux soient souvent toxiques à de faibles concentrations, les bioéléments construits sont eux aussi capables de les détecter à de très faibles concentrations. Dans le cas de l'arsenic, une limite de détection par bioélément bactérien de 1 µg.L⁻¹ a été rapportée (Roberto et al. 2002).

Enfin, les bactéries sont bien adaptées pour le développement de bioéléments du fait de leurs larges tailles de population, des conditions de culture faciles et un taux de croissance rapide, ce qui conduit à des faibles coûts de production.

3.3.1.2. Limites

Tout d'abord, il n'existe pas de régulateur transcriptionnel pour chaque molécule, ce qui peut limiter les constructions de souches et les détections.

Ensuite, à cause de redondances dans le contrôle transcriptionnel, d'autres facteurs de transcription peuvent interférer avec la voie de signalisation du bioélément, ce qui peut conduire à une plus faible sensibilité de celui-ci. Par exemple, les mécanismes d'efflux naturels peuvent rentrer en compétition avec les mécanismes d'efflux rapporteurs, ce qui diminue la sensibilité des bioéléments rapporteurs (Hynninen et al. 2010; Kang et al. 2018). Il en est de même avec les mécanismes impliqués dans l'export, la modification ou la dégradation des molécules. Dans le cas du mercure, il est possible que celui-ci se volatilise avant d'être détecté par la molécule régulatrice MerR (Yu et al. 1996). Enfin, les bioéléments bactériens manquent de spécificité de détection. Malgré le fait que cette limitation puisse être compensée par la mise en place d'analyses statistiques, ceci nécessite toutefois une expertise dans le domaine de l'analyse de données.

Suite aux bioéléments bactériens, les avantages et les limites liés à l'analyse transcriptomique avec la collection de souches d'*E. coli* fluorescentes vont être abordés.

3.3.2. Etude transcriptomique à l'aide de la collection de souches fluorescentes

3.3.2.1. Avantages

Malgré le fait que ces analyses soient réalisées sur la bactérie *E. coli* spécifiquement, les résultats obtenus sont extrapolables à d'autres organismes supérieurs. En effet, de nombreuses voies métaboliques sont conservés entre les bactéries et les vertébrés dans le cas de la réponse aux stress (Zhang et al. 2011), tout comme en réponse à la génotoxicité (Elad et al. 2015).

Ensuite, la transcriptomique est basée sur des connaissances mécanistiques et du mode d'action sur l'ensemble du génome. En comparaison aux bioéléments faisant appel aux bactéries génétiquement modifiées qui ne ciblent qu'un gène, l'information apportée est alors plus riche et précise.

Enfin, cette technique peut être réalisée à grande échelle, en un temps relativement restreint (< 12 heures pour l'acquisition des données). Ceci permet d'accéder rapidement à l'information, ce qui permet un criblage en amont, dès l'observation des premiers effets toxiques (Schirmer et al. 2010). Ceci s'oppose à certains bioéléments, lesquels sont réalisés sur plusieurs jours.

3.3.2.2. Limites

Tout d'abord, les souches sont construites sur la base d'une fusion transcriptionnelle entre les promoteurs connus de la bactérie avec le gène rapporteur *gfp*. Cependant, de nombreux transcrits ne sont pas décrits ou possèdent des fonctions hypothétiques, rendant parfois difficile l'interprétation des résultats. De plus, alors qu'il est présumé que des profils transcriptionnels peuvent être similaires entre classes de contaminants, il est aussi concevable que différents contaminants convergent vers des effets toxiques similaires. Le rapprochement entre un transcrit et

une fonction, et *a fortiori*, l'implication d'une voie métabolique en réponse à un inducteur peuvent être plus difficiles à établir (Neumann and Galvez 2002).

Enfin, l'analyse de données est une étape complexe qui nécessite une expertise statistique. De plus, du fait que chaque laboratoire applique des conditions de tests ainsi que des analyses différentes, la standardisation des données entre laboratoires est difficile et peu réalisée.

3.4. Conclusions sur la méthode développée pour l'évaluation de la présence et de la toxicité liée aux métaux

Au cours de ces travaux, nous avons mis au point une méthode multiparamétrique bactérienne pour la détection, l'identification et la semi-quantification des métaux biodisponibles au sein d'échantillons environnementaux. L'ensemble de ces méthodes permettent de réaliser une caractérisation d'un échantillon, validant de ce fait l'applicabilité des analyses biologiques pour la détection de métaux au sein d'échantillons environnementaux. De plus, seules sept souches bioluminescentes et 175 souches fluorescentes sont suffisantes pour cette caractérisation. De par le nombre restreint de souches impliquées, la caractérisation d'un échantillon peut être réalisée en un jour seulement.

Après avoir démontré la possibilité de mise en œuvre de cette méthode biologique pour la détection des métaux, il serait intéressant dans la suite des études de réaliser le même travail sur d'autres molécules. Le choix s'est porté sur la détection de molécules composant la famille des *s*-triazines, dont fait partie l'atrazine. Ces travaux ont été débutés et ont conduit à la construction de deux souches bioluminescentes détectrices d'acide cyanurique et d'atrazine. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Hua et al. 2015). La suite de ces travaux seront portés sur la mise en place des profils de réponse transcriptomiques relatifs à cette famille de composés. Au-delà du choix de la molécule, la méthodologie développée au cours de ces travaux peut être appliquée à tous types de détection, dans tous types d'environnements. A terme, il s'agit de réaliser une banque de profils transcriptomiques, référençant des molécules appartenant à des familles différentes.

Il pourrait aussi être intéressant de simplifier l'utilisation de ces souches bactériennes ainsi que l'analyse des données, dans le but d'une application dans le contexte industriel ou bien de terrain. Il s'agirait alors de transformer cet outil expérimental en outil applicatif. Les travaux précédents réalisés sur les souches bioluminescences lyophilisées en plus du système d'interprétation des résultats par arbre de décision est actuellement facile d'accès. Concernant les souches fluorescentes, il est possible de semi-automatiser leur utilisation. Par la réduction de la collection aux souches d'intérêt, à leur intégration au sein de microplaques 384 puits ainsi qu'à l'utilisation de robots pipeteurs automatisés (exemple de ep*Motion*[®] 5070 de la marque Eppendorf), les étapes expérimentales s'en retrouvent grandement facilitées et allégées. De même, les étapes analytiques peuvent être simplifiées par la réalisation d'une interface qui, suite à la lecture des plaques de fluorescence, analyserait et interpréterait les données transcriptomiques en comparaison à la banque de données.

A terme, il pourrait être envisagé de poursuivre la caractérisation des environnements à différents niveaux avec l'intégration de méthodes –omiques, telles que la protéomique et la métabolomique (Ranjard et al. 2017). En effet, avec le couplage des outils existants avec des nouvelles approches à haut débit, la caractérisation d'un environnement sera plus précise et informative. Par ce biais, il sera possible de définir la nature d'une contamination et d'en caractériser les effets toxiques associés à différents niveaux et ceci au sein d'échantillons environnementaux, mêmes complexes.

BIBLIOGRAPHIE

- Afshari CA, Nuwaysir EF, Barrett JC (1999) Application of Complementary DNA Microarray Technology to Carcinogen Identification, Toxicology, and Drug Safety Evaluation. Cancer Res 59:4759–4760
- Amiard J-C (2011) Les risques chimiques environnementaux : Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier
- Andres J, Bertin PN (2016) The microbial genomics of arsenic. FEMS Microbiol Rev 40:299–322 . doi: 10.1093/femsre/fuv050
- Argüello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides T (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. Front Cell Infect Microbiol 3:73 . doi: 10.3389/fcimb.2013.00073
- Arredondo M, Martínez R, Núñez MT, et al (2006) Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. Biol Res 39:95–102
- Arredondo M, Núñez MT (2005) Iron and copper metabolism. Mol Aspects Med 26:313–327 . doi: 10.1016/j.mam.2005.07.010
- Backhaus T, Altenburger R, Boedeker W, et al (2000) Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to Vibrio fischeri. Environ Toxicol Chem 19:2348– 2356 . doi: 10.1002/etc.5620190927
- Balkani S, Shamekhi S, Raoufinia R, et al (2016) Purification and Characterization of Bovine Serum Albumin Using Chromatographic Method. Adv Pharm Bull 6:651–654 . doi: 10.15171/apb.2016.080
- Baumann B, van der Meer JR (2007) Analysis of Bioavailable Arsenic in Rice with Whole Cell Living Bioreporter Bacteria. J Agric Food Chem 55:2115–2120
- Behera M, Dandapat J, Rath CC (2014) Effect of heavy metals on growth response and antioxidant defense protection in Bacillus cereus. J Basic Microbiol 54:1201–1209 . doi: 10.1002/jobm.201300805
- Belkin S, Smulski DR, Vollmer AC, et al (1996) Oxidative stress detection with Escherichia coli harboring a katG'::lux fusion. Appl Environ Microbiol 62:2252–2256
- Ben-Israel O, Ben-Israel H, Ulitzur S (1998) Identification and Quantification of Toxic Chemicals by Use of Escherichia coli Carryinglux Genes Fused to Stress Promoters. Appl Environ Microbiol 64:4346–4352
- Berno E, Pereira Marcondes DF, Ricci Gamalero S, Eandi M (2004) Recombinant Escherichia coli for the biomonitoring of benzene and its derivatives in the air. Ecotoxicol Environ Saf 57:118– 122 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.10.005
- Bhattacharyya J, Read D, Amos S, et al (2005) Biosensor-based diagnostics of contaminated groundwater: assessment and remediation strategy. Environ Pollut 134:485–492 . doi: 10.1016/j.envpol.2004.09.002
- Bier FF, Kleinjung F (2014) Feature-size limitations of microarray technology a critical review. Fresenius J Anal Chem 371:151–156 . doi: 10.1007/s002160101003

Binet MR, Poole RK (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in Escherichia coli. FEBS Lett 473:67–70

Bisson M, Amara A, Hulot C, Marescaux N (2016) Plomb et ses dérivés inorganiques - INERIS

Bisson M, Diderich R, Hulot C, et al (2005) Zinc et ses dérivés - INERIS

- Bisson M, Houeix N (2014) Cadmium et ses dérivés INERIS
- Bisson M, La Rocca B, Houeix N, Andres S (2010a) Arsenic et ses dérivés inorganiques INERIS
- Bisson M, Vincent JM, Houeix N, et al (2010b) Mercure et ses dérivés INERIS
- Bittel M, Cordella CBY, Assaf A, et al (2015) Potential of Raman Spectroscopy To Monitor Arsenic Toxicity on Bacteria: Insights toward Multiparametric Bioassays. Environ Sci Technol 49:12324–12332. doi: 10.1021/acs.est.5b03013
- Bolelli L, Bobrovová Z, Ferri E, et al (2006) Bioluminescent bacteria assay of veterinary drugs in excreta of food-producing animals. J Pharm Biomed Anal 42:88–93 . doi: 10.1016/j.jpba.2005.12.034
- Borremans B, Hobman JL, Provoost A, et al (2001) Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of Ralstonia metallidurans CH34. J Bacteriol 183:5651–5658 . doi: 10.1128/JB.183.19.5651-5658.2001
- Boyanapalli R, Bullerjahn GS, Pohl C, et al (2007) Luminescent Whole-Cell Cyanobacterial Bioreporter for Measuring Fe Availability in Diverse Marine Environments. Appl Environ Microbiol 73:1019–1024
- Brandt KK, Holm PE, Nybroe O (2009) Bioavailability and toxicity of soil particle-associated copper as determined by two bioluminescent Pseudomonas fluorescens biosensor strains. Environ Toxicol Chem 25:1738–1741. doi: 10.1897/05-558R.1
- Briscoe SF, Diorio C, DuBow MS (1996) Luminescent Biosensors for the Detection of Tributyltin and Dimethyl Sulfoxide and the Elucidation of Their Mechanisms of Toxicity. In: Environmental Biotechnology. pp 645–655
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial Resistance to Metals in the Environment. Ecotoxicol Environ Saf 45:198–207 . doi: 10.1006/eesa.1999.1860
- Bumgarner R (2013) Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. Curr Protoc Mol Biol Ed Frederick M Ausubel Al Chapter 22:Unit 22.1. . doi: 10.1002/0471142727.mb2201s101
- Cai J, DuBow MS (1997) Use of a luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterization of arsenic toxicity of chromated copper arsenate (CCA). Biodegradation 8:105–111
- Cerminati S, Soncini FC, Checa SK (2011) Selective detection of gold using genetically engineered bacterial reporters. Biotechnol Bioeng 108:2553–2560. doi: 10.1002/bit.23213
- Cervantes C, ji G, Ramirez J, Silver S (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. FEMS Microbiol Rev 15:355–367 . doi: 10.1016/0168-6445(94)90069-8

- Charrier T, Durand MJ, Jouanneau S, et al (2011) A multi-channel bioluminescent bacterial biosensor for the on-line detection of metals and toxicity. Part I: design and optimization of bioluminescent bacterial strains. Anal Bioanal Chem 400:1051–1060
- Checa SK, Espariz M, Audero MEP, et al (2007) Bacterial sensing of and resistance to gold salts. Mol Microbiol 63:1307–1318 . doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05590.x
- Checa SK, Soncini FC (2010) Bacterial gold sensing and resistance. BioMetals 24:419–427 . doi: 10.1007/s10534-010-9393-2
- Christophoridis C, Dedepsidis D, Fytianos K (2009) Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. J Hazard Mater 168:1082–1091
- Corbisier P, Ji G, Nuyts G, et al (1993) luxAB gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of Staphylococcus aureus plasmid pl258. FEMS Microbiol Lett 110:231–238
- Cordella CBY, Bertrand D (2014) SAISIR: A new general chemometric toolbox. TrAC Trends Anal Chem 54:75–82 . doi: 10.1016/j.trac.2013.10.009
- Costa M, Kraker AJ, Patierno SR (1984) Toxicity and Carcinogenicity of Essential and Non-essential Metals. In: Essential and Non-Essential Metals Metabolites with Antibiotic Activity Pharmacology of Benzodiazepines Interferon Gamma Research. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–45
- Defew LH, Mair JM, Guzman HM (2005) An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. Mar Pollut Bull 50:547–552 . doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.11.047
- Directive 2000/60/CE Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau
- Directive 2006/118/CE Directive 2006/118/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 décembre 2006 sur la protection des eaux souterraines contre la pollution et la détérioration
- Directive 2008/105/CE Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau
- Directive 2013/39/UE Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 concernant les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau
- Durand MJ, Hua A, Jouanneau S, et al (2015) Detection of Metal and Organometallic Compounds with Bioluminescent Bacterial Bioassays. Adv Biochem Eng Biotechnol. doi: 10.1007/10_2015_332
- Durand MJ, Thouand G, Dancheva-Ivanova T, et al (2003) Specific detection of organotin compounds with a recombinant luminescent bacteria. Chemosphere 52:103–111
- Elad T, Belkin S (2013) Broad spectrum detection and "barcoding" of water pollutants by a genomewide bacterial sensor array. Water Res 47:3782–3790 . doi: 10.1016/j.watres.2013.04.011

- Elad T, Benovich E, Magrisso S, Belkin S (2008) Toxicant Identification by a Luminescent Bacterial Bioreporter Panel: Application of Pattern Classification Algorithms. Environ Sci Technol 42:8486–8491. doi: 10.1021/es801489a
- Elad T, Seo HB, Belkin S, Gu MB (2015) High-throughput prescreening of pharmaceuticals using a genome-wide bacterial bioreporter array. Biosens Bioelectron 68:699–704 . doi: 10.1016/j.bios.2015.01.067
- Erbe JL, Adams AC, Taylor KB, Hall LM (1996) Cyanobacteria carrying an smt-lux transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. J Ind Microbiol 17:80–83
- Evans LJ (1989) Chemistry of metal retention by soils. Environ Sci Technol 23:1046–1056 . doi: 10.1021/es00067a001
- Fantino J-R, Py B, Fontecave M, Barras F (2010) A genetic analysis of the response of Escherichia coli to cobalt stress. Environ Microbiol 12:2846–2857. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02265.x
- Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero JL, et al (2009) Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. Microb Cell Factories 8:17 . doi: 10.1186/1475-2859-8-17
- Festa RA, Thiele DJ (2011) Copper: An essential metal in biology. Curr Biol 21:R877–R883 . doi: 10.1016/j.cub.2011.09.040
- Florence TM, Morrison GM, Stauber JL (1992) Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. Sci Total Environ 125:1–13 . doi: 10.1016/0048-9697(92)90377-5
- Flynn HC, Mc Mahon V, Diaz GC, et al (2002) Assessment of bioavailable arsenic and copper in soils and sediments from the Antofagasta region of northern Chile. Sci Total Environ 286:51–59
- Förstner U, Wittmann GTW (2012) Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer Science & Business Media
- Foucault Y, Durand MJ, Tack K, et al (2013) Use of ecotoxicity test and ecoscores to improve the management of polluted soils: case of a secondary lead smelter plant. J Hazard Mater 246–247:291–299
- Fulladosa E, Murat J-C, Villaescusa I (2005) Study on the toxicity of binary equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria Vibrio fischeri as a biological target. Chemosphere 58:551–557. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.007
- Garrick MD, Núñez MT, Olivares M, Harris ED (2003) Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. Biometals 16:1–8. doi: 10.1023/A:1020735401734
- Gault M, Effantin G, Rodrigue A (2016) Ni exposure impacts the pool of free Fe and modifies DNA supercoiling via metal-induced oxidative stress in Escherichia coli K-12. Free Radic Biol Med 97:351–361. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.030
- Gault M, Rodrigue A (2016) Data set for transcriptome analysis of Escherichia coli exposed to nickel. Data Brief 9:314–317 . doi: 10.1016/j.dib.2016.08.069
- Girotti S, Ferri EN, Fumo MG, Maiolini E (2008) Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. Anal Chim Acta 608:2–29

- Gómez-Sagasti MT, Becerril JM, Martín I, et al (2014) cDNA microarray assessment of early gene expression profiles in Escherichia coli cells exposed to a mixture of heavy metals. Cell Biol Toxicol 30:207–232. doi: 10.1007/s10565-014-9281-6
- Gromaire Mertz MC (2000) La pollution des eaux pluviales urbaines en réseau d'assainissement unitaire - Caractéristiques et origines. Houille Blanche 66–70. doi: 10.1051/lhb/2000018
- Gross C, Kelleher M, Iyer VR, et al (2000) Identification of the copper regulon in Saccharomyces cerevisiae by DNA microarrays. J Biol Chem 275:32310–32316 . doi: 10.1074/jbc.M005946200
- Grynkiewicz M, Polkowska Ż, Górecki T, Namieśnik J (2001) Volatile Organochlorine Compounds and Pesticides in Precipitation from an Urban Region (gdańsk, Poland). Anal Lett 34:1503–1515 . doi: 10.1081/AL-100104923
- Gueuné H, Durand MJ, Thouand G, DuBow MS (2008) The ygaVP genes of Escherichia coli form a tributyltin-inducible operon. Appl Environ Microbiol 74:1954–1958
- Gueuné H, Thouand G, Durand MJ (2009) A new bioassay for the inspection and identification of TBTcontaining antifouling paint. Mar Pollut Bull 58:1734–1738
- Guzzo A, DuBow MS (1991) Construction of stable, single-copy luciferase gene fusions in Escherichia coli. Arch Microbiol 156:444–448
- Guzzo J, Guzzo A, DuBow MS (1992) Characterization of the effects of aluminum on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. Toxicol Lett 64–65 Spec No:687–693
- Hakkila K, Maksimow M, Rosengren A, et al (2003) Monitoring promoter activity in a single bacterial cell by using green and red fluorescent proteins. J Microbiol Methods 54:75–79 . doi: 10.1016/S0167-7012(03)00008-3
- Hamadeh HK, Amin RP, Paules RS, Afshari CA (2002) An overview of toxicogenomics. Curr Issues Mol Biol 4:45–56
- Hansen LH, Aarestrup F, Sørensen SJ (2002) Quantification of bioavailable chlortetracycline in pig feces using a bacterial whole-cell biosensor. Vet Microbiol 87:51–57 . doi: 10.1016/S0378-1135(02)00029-9
- He Z, Gentry TJ, Schadt CW, et al (2007) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. ISME J 1:67 . doi: 10.1038/ismej.2007.2
- Hernandez L, Probst A, Probst JL, Ulrich E (2003) Heavy metal distribution in some French forest soils: evidence for atmospheric contamination. Sci Total Environ 312:195–219 . doi: 10.1016/S0048-9697(03)00223-7
- Hever N, Belkin S (2006) A Dual-Color Bacterial Reporter Strain for the Detection of Toxic and Genotoxic Effects. Eng Life Sci 6:319–323 . doi: 10.1002/elsc.200620132
- Hua A, Gueuné H, Cregut M, et al (2015) Development of a bacterial bioassay for atrazine and cyanuric acid detection. Front Microbiol 6:211 . doi: 10.3389/fmicb.2015.00211

- Hubálek Z (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 46:205–229
- Hynninen A, Tönismann K, Virta M (2010) Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals. Bioeng Bugs 1:132–138
- Hynninen A, Touzé T, Pitkänen L, et al (2009) An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. Mol Microbiol 74:384–394 . doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x
- Iaconelli C, Lemetais G, Kechaou N, et al (2015) Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. J Biotechnol 214:17–26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.022
- Israeli E, Giberman E, Kohn A (1974) Membrane malfunctions in freeze-dried Escherichia coli. Cryobiology 11:473–477. doi: 10.1016/0011-2240(74)90115-1
- Ivask A, Green T, Polyak B, et al (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. Biosens Bioelectron 22:1396–1402
- Ivask A, Rolova T, Kahru A (2009) A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. Bmc Biotechnol 9:41
- Ivask A, Virta M, Kahru A (2002) Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil. Soil Biol Biochem 34:1439–1447
- Iwig JS, Leitch S, Herbst RW, et al (2008) Ni(II) and Co(II) Sensing by Escherichia coli RcnR. J Am Chem Soc 130:7592–7606 . doi: 10.1021/ja710067d
- Iwig JS, Rowe JL, Chivers PT (2006) Nickel homeostasis in Escherichia coli the rcnR-rcnA efflux pathway and its linkage to NikR function. Mol Microbiol 62:252–262 . doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05369.x
- Jouanneau S (2011) Développement d'une méthodologie d'analyse de données par arbre de décision appliquée à un biocapteur multicanal. Université de Nantes
- Jouanneau S, Durand MJ, Courcoux P, et al (2011) Improvement of the identification of four heavy metals in environmental samples by using predictive decision tree models coupled with a set of five bioluminescent bacteria. Environ Sci Technol 45:2925–2931
- Juhnke S, Peitzsch N, Hübener N, et al (2002) New genes involved in chromate resistance in Ralstonia metallidurans strain CH34. Arch Microbiol 179:15–25 . doi: 10.1007/s00203-002-0492-5
- Kalantari N, Ghaffari S (2008) Evaluation of toxicity of heavy metals for Escherichia coli growth. J Environ Health Sci Eng 5:173–178
- Kang Y, Lee W, Kim S, et al (2018) Enhancing the copper-sensing capability of Escherichia coli-based whole-cell bioreporters by genetic engineering. Appl Microbiol Biotechnol 102:1513–1521 . doi: 10.1007/s00253-017-8677-7

- Kershaw CJ, Brown NL, Constantinidou C, et al (2005) The expression profile of Escherichia coli K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. Microbiology 151:1187– 1198. doi: 10.1099/mic.0.27650-0
- Khang Y, Yang Z, Burlage R (1997) Measurement of iron-dependence of pupA promoter activity by a pup-lux bioreporter. J Microbiol Biotechnol 7:352–355
- Köhler S, Belkin S, Schmid RD (2000) Reporter gene bioassays in environmental analysis. Fresenius J Anal Chem 366:769–779. doi: 10.1007/s002160051571
- LaVoie SP, Mapolelo DT, Cowart DM, et al (2015) Organic and inorganic mercurials have distinct effects on cellular thiols, metal homeostasis, and Fe-binding proteins in Escherichia coli. J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem 20:1239–1251. doi: 10.1007/s00775-015-1303-1
- LaVoie SP, Summers AO (2017) Transcriptional responses of Escherichia coli during recovery from inorganic or organic mercury exposure. bioRxiv 161646 . doi: 10.1101/161646
- Lee LJ, Barrett JA, Poole RK (2005) Genome-Wide Transcriptional Response of Chemostat-Cultured Escherichia coli to Zinc. J Bacteriol 187:1124–1134 . doi: 10.1128/JB.187.3.1124-1134.2005
- Leth S, Maltoni S, Simkus R, et al (2002) Engineered Bacteria Based Biosensors for Monitoring Bioavailable Heavy Metals. Electroanalysis 14:35–42 . doi: 10.1002/1521-4109(200201)14:1<35::AID-ELAN35>3.0.CO;2-W
- Lettieri T (2006) Recent Applications of DNA Microarray Technology to Toxicology and Ecotoxicology. Environ Health Perspect 114:4–9 . doi: 10.1289/ehp.8194
- Li B, Tian F, Liu X, et al (2011) Effects of cryoprotectants on viability of Lactobacillus reuteri CICC6226. Appl Microbiol Biotechnol 92:609–616 . doi: 10.1007/s00253-011-3269-4
- Li Y-F, Li F-Y, Ho C-L, Liao VH-C (2008) Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. Environ Pollut 152:123–129 . doi: 10.1016/j.envpol.2007.05.002
- Liu T, Golden JW, Giedroc DP (2005) A zinc(II)/lead(II)/cadmium(II)-inducible operon from the Cyanobacterium anabaena is regulated by AztR, an alpha3N ArsR/SmtB metalloregulator. Biochemistry (Mosc) 44:8673–8683 . doi: 10.1021/bi050450+
- Lobanov AV, Borisov IA, Gordon SH, et al (2001) Analysis of ethanol–glucose mixtures by two microbial sensors: application of chemometrics and artificial neural networks for data processing. Biosens Bioelectron 16:1001–1007. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00246-9
- López-Fernández H, Reboiro-Jato M, Glez-Peña D, Fernández-Riverola F (2014) A comprehensive analysis about the influence of low-level preprocessing techniques on mass spectrometry data for sample classification. Int J Data Min Bioinforma 10:455–473
- Magi E, Righetti C, Carro MD, et al (2005) Study of the water quality close to urban sewers in eastern Ligurian coast by means of bioluminescence tests and conventional analyses. Chem Ecol 21:47–60. doi: 10.1080/02757540512331323935
- Magrisso S, Erel Y, Belkin S (2008) Microbial reporters of metal bioavailability. Microb Biotechnol 1:320–330

- Manta DS, Angelone M, Bellanca A, et al (2002) Heavy metals in urban soils: a case study from the city of Palermo (Sicily), Italy. Sci Total Environ 300:229–243 . doi: 10.1016/S0048-9697(02)00273-5
- Maurice D (2014) Industries et environnement. Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie
- McCready S, Spyrakis G, Greely CR, et al (2004) Toxicity of Surficial Sediments from Sydney Harbour and Vicinity, Australia. Environ Monit Assess 96:53–83 . doi: 10.1023/B:EMAS.0000031716.34645.71
- McQuillan JS, Shaw AM (2014) Differential gene regulation in the Ag nanoparticle and Ag(+)-induced silver stress response in Escherichia coli: a full transcriptomic profile. Nanotoxicology 8 Suppl 1:177–184 . doi: 10.3109/17435390.2013.870243
- Melamed S, Naftaly S, Belkin S (2014) Improved detection of antibiotic compounds by bacterial reporter strains achieved by manipulations of membrane permeability and efflux capacity. Appl Microbiol Biotechnol 98:2267–2277 . doi: 10.1007/s00253-013-5176-3
- Mello LD, Kubota LT (2002) Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Food Chem 77:237–256 . doi: 10.1016/S0308-8146(02)00104-8
- Mergeay M, Monchy S, Vallaeys T, et al (2003) Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol Rev 27:385–410
- Miquel G (2001) Les effets de métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques
- Mitchell RJ, Gu MB (2004) An Escherichia coli biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage. Appl Microbiol Biotechnol 64:46–52 . doi: 10.1007/s00253-003-1418-0
- Mohapatra SK, Krishnan A (2011) Microarray data analysis. Methods Mol Biol Clifton NJ 678:27–43 . doi: 10.1007/978-1-60761-682-5_3
- Mortensen JL (1963) Complexing of Metals by Soil Organic Matter 1. Soil Sci Soc Am J 27:179–186 . doi: 10.2136/sssaj1963.03615995002700020027x
- Munson GP, Lam DL, Outten FW, O'Halloran TV (2000) Identification of a copper-responsive twocomponent system on the chromosome of Escherichia coli K-12. J Bacteriol 182:5864–5871
- Murray AE, Lies D, Li G, et al (2001) DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. Proc Natl Acad Sci 98:9853–9858 . doi: 10.1073/pnas.171178898

Nature Publishing Group (2007) Transposons: cut-and-paste gene delivery. Nat Methods 4:183–186

- Naylor LH (1999) Reporter gene technology: the future looks bright. Biochem Pharmacol 58:749–757 . doi: 10.1016/S0006-2952(99)00096-9
- Neumann NF, Galvez F (2002) DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? Biotechnol Adv 20:391–419 . doi: 10.1016/S0734-9750(02)00025-3

- Niazi JH, Kim BC, Ahn J-M, Gu MB (2008) A novel bioluminescent bacterial biosensor using the highly specific oxidative stress-inducible pgi gene. Biosens Bioelectron 24:670–675 . doi: 10.1016/j.bios.2008.06.026
- Nies A, Nies DH, Silver S (1989) Cloning and expression of plasmid genes encoding resistances to chromate and cobalt in Alcaligenes eutrophus. J Bacteriol 171:5065–5070
- Nota B, Verweij RA, Molenaar D, et al (2010) Gene Expression Analysis Reveals a Gene Set Discriminatory to Different Metals in Soil. Toxicol Sci 115:34–40. doi: 10.1093/toxsci/kfq043
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, et al (1999) Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. Mol Carcinog 24:153–159
- Oberemm A, Onyon L, Gundert-Remy U (2005) How can toxicogenomics inform risk assessment? Toxicol Appl Pharmacol 207:592–598 . doi: 10.1016/j.taap.2005.01.044
- Oshlack A, Robinson MD, Young MD (2010) From RNA-seq reads to differential expression results. Genome Biol 11:220 . doi: 10.1186/gb-2010-11-12-220
- Oshlack A, Wakefield MJ (2009) Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. Biol Direct 4:14 . doi: 10.1186/1745-6150-4-14
- Osman D, Waldron KJ, Denton H, et al (2010) Copper homeostasis in Salmonella is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. J Biol Chem 285:25259–25268 . doi: 10.1074/jbc.M110.145953
- Palmer G, McFadzean R, Killham K, et al (1998) Use of lux-based biosensors for rapid diagnosis of pollutants in arable soils. Chemosphere 36:2683–2697 . doi: 10.1016/S0045-6535(97)10225-9
- Park GS, Lee SH, Park SY, et al (2005) Ecotoxicological evaluation of sewage sludge using bioluminescent marine bacteria and rotifer. Ocean Sci J 40:91–100 . doi: 10.1007/BF03028589
- Parrello D (2014) Conception de biosenseurs fluorescents multicolores pour l'identification in vivo des interactions bio-physicochimiques dans les systèmes minéral-bactérie. Université de Lorraine
- Peca L, Kós PB, Máté Z, et al (2008) Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc. FEMS Microbiol Lett 289:258–264
- Peitzsch N, Eberz G, Nies DH (1998) Alcaligenes eutrophus as a bacterial chromate sensor. Appl Environ Microbiol 64:453–458
- Pereira C, Leão M, Soares J, et al (2012) New therapeutic strategies for cancer and neurodegeneration emerging from yeast cell-based systems. Curr Pharm Des 18:4223–4235
- Philp JC, Balmand S, Hajto E, et al (2003) Whole cell immobilised biosensors for toxicity assessment of a wastewater treatment plant treating phenolics-containing waste. Anal Chim Acta 487:61– 74 . doi: 10.1016/S0003-2670(03)00358-1

Pichard A, Bisson M, Diderich R, et al (2005a) Chrome et ses dérivés - INERIS

Pichard A, Bisson M, Houeix N, et al (2005b) Cuivre et ses dérivés - INERIS

- Piña B, Barata C (2011) A genomic and ecotoxicological perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. Aquat Toxicol Amst Neth 105:40–49 . doi: 10.1016/j.aquatox.2011.06.006
- Plegge V, Slama M, Süselbeck B, et al (2000) Analysis of Ternary Mixtures with a Single Dynamic Microbial Sensor and Chemometrics Using a Nonlinear Multivariate Calibration. Anal Chem 72:2937–2942. doi: 10.1021/ac991034w
- Qasim B (2015) Détermination, spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminés et technosols. Université d'Orléans
- Quackenbush J (2006) Microarray Analysis and Tumor Classification. N Engl J Med 354:2463–2472 . doi: 10.1056/nejmra042342
- Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. Proc Natl Acad Sci 79:5971–5975
- Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, et al (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. BioMetals 21:321–332 . doi: 10.1007/s10534-007-9121-8
- Ranjard L, Maron P-A, Cuny P, d'Oiron Verame E (2017) La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental, ADEME
- Raoufinia R, Mota A, Nozari S, et al (2016) A methodological approach for purification and characterization of human serum albumin. J Immunoassay Immunochem 37:623–635 . doi: 10.1080/15321819.2016.1184163
- Rasmussen LD, Sørensen SJ, Turner RR, Barkay T (2000) Application of a mer-lux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. Soil Biol Biochem 32:639–646 . doi: 10.1016/S0038-0717(99)00190-X
- Rathnayake IVN, Megharaj M, Krishnamurti GSR, et al (2013) Heavy metal toxicity to bacteria Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? Chemosphere 90:1195–1200 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.09.036
- Reeder RJ, Schoonen MAA, Lanzirotti A (2006) Metal Speciation and Its Role in Bioaccessibility and Bioavailability. Rev Mineral Geochem 64:59–113 . doi: 10.2138/rmg.2006.64.3
- Rensing C, Fan B, Sharma R, et al (2000) CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A 97:652–656
- Rensing C, Mitra B, Rosen BP (1997) The zntA gene of Escherichia coli encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A 94:14326–14331
- Rensing C, Sun Y, Mitra B, Rosen BP (1998) Pb(II)-translocating P-type ATPases. J Biol Chem 273:32614–32617. doi: 10.1074/jbc.273.49.32614

Ribera D, Taberly J (2011) Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques

- Riether KB, Dollard MA, Billard P (2001) Assessment of heavy metal bioavailability using Escherichia coli zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors. Appl Microbiol Biotechnol 57:712–716
- Roberto FF, Barnes JM, Bruhn DF (2002) Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. Talanta 58:181–188. doi: 10.1016/S0039-9140(02)00266-7
- Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, et al (2011) Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias., Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. Genome Biol Genome Biol 12, 12:R22, R22–R22 . doi: 10.1186/gb-2011-12-3-r22, 10.1186/gb-2011-12-3-r22
- Rodriguez-Mozaz S, Alda MJL de, Barceló D (2006) Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. Anal Bioanal Chem 386:1025–1041 . doi: 10.1007/s00216-006-0574-3
- Rodriguez-Mozaz S, Alda MJL de, Marco M-P, Barceló D (2005) Biosensors for environmental monitoring: A global perspective. Talanta 65:291–297 . doi: 10.1016/j.talanta.2004.07.006
- Rodriguez-Mozaz S, Marco M-P, Lopez de Alda MJ, Barceló D (2004) Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. Anal Bioanal Chem 378:588–598 . doi: 10.1007/s00216-003-2385-0
- Ross W, Park SJ, Summers AO (1989) Genetic analysis of transcriptional activation and repression in the Tn21 mer operon. J Bacteriol 171:4009–4018
- Sagi E, Hever N, Rosen R, et al (2003) Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. Sens Actuators B Chem 90:2–8. doi: 10.1016/S0925-4005(03)00014-5
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory
- Saulou-Bérion C, Gonzalez I, Enjalbert B, et al (2015) Escherichia coli under Ionic Silver Stress: An Integrative Approach to Explore Transcriptional, Physiological and Biochemical Responses. PloS One 10:e0145748 . doi: 10.1371/journal.pone.0145748
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270:467–470
- Schenborn E, Groskreutz D (1999) Reporter gene vectors and assays. Mol Biotechnol 13:29–44 . doi: 10.1385/MB:13:1:29
- Schiewe MH, Hawk EG, Actor DI, Krahn MM (1985) Use of a Bacterial Bioluminescence Assay to Assess Toxicity of Contaminated Marine Sediments. Can J Fish Aquat Sci 42:1244–1248 . doi: 10.1139/f85-154
- Schirmer K, Fischer BB, Madureira DJ, Pillai S (2010) Transcriptomics in ecotoxicology. Anal Bioanal Chem 397:917–923 . doi: 10.1007/s00216-010-3662-3
- Selifonova O, Burlage R, Barkay T (1993) Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. Appl Environ Microbiol 59:3083–3090

- Sharma P, Asad S, Ali A (2013) Bioluminescent bioreporter for assessment of arsenic contamination in water samples of India. J Biosci 38:251–258 . doi: 10.1007/s12038-013-9305-z
- Sharma RK, Kumar A, Joseph PE (2008) Removal of atrazine from water by low cost adsorbents derived from agricultural and industrial wastes. Bull Environ Contam Toxicol 80:461–464 . doi: 10.1007/s00128-008-9389-6
- Siaterlis A, Deepika G, Charalampopoulos D (2009) Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. Lett Appl Microbiol 48:295–301 . doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02529.x
- Sinskey TJ, Silverman GJ (1970) Characterization of Injury Incurred by Escherichia coli upon Freeze-Drying. J Bacteriol 101:429–437
- Solioz M, Abicht HK, Mermod M, Mancini S (2010) Response of Gram-positive bacteria to copper stress. JBIC J Biol Inorg Chem 15:3 . doi: 10.1007/s00775-009-0588-3
- Sticher P, Jaspers MC, Stemmler K, et al (1997) Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. Appl Environ Microbiol 63:4053–4060
- Stocker J, Balluch D, Gsell M, et al (2003) Development of a Set of Simple Bacterial Biosensors for Quantitative and Rapid Measurements of Arsenite and Arsenate in Potable Water. Environ Sci Technol 37:4743–4750
- Stoyanov JV, Brown NL (2003) The Escherichia coli copper-responsive copA promoter is activated by gold. J Biol Chem 278:1407–1410 . doi: 10.1074/jbc.C200580200
- Stoyanov JV, Magnani D, Solioz M (2003) Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of Escherichia coli. FEBS Lett 546:391–394
- Su G, Zhang X, Liu H, et al (2011) Toxicogenomic mechanisms of 6-HO-BDE-47, 6-MeO-BDE-47, and BDE-47 in E. coli. Environ Sci Technol 46:1185–1191 . doi: 10.1021/es203212w
- Su G, Zhang X, Raine JC, et al (2013) Mechanisms of toxicity of triphenyltin chloride (TPTC) determined by a live cell reporter array. Environ Sci Pollut Res Int 20:803–811 . doi: 10.1007/s11356-012-1280-7
- Tam S, Tsao M-S, McPherson JD (2015) Optimization of miRNA-seq data preprocessing. Brief Bioinform 16:950–963. doi: 10.1093/bib/bbv019
- Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M (1997) Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. Appl Environ Microbiol 63:4456–4461
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch A (ed) Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 3: Environmental Toxicology. Springer Basel, Basel, pp 133–164
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72:211. doi: 10.1007/s00253-006-0465-8

- Tibazarwa C, Corbisier P, Mench M, et al (2001) A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. Environ Pollut 113:19–26
- Trang PTK, Berg M, Viet PH, et al (2005) Bacterial Bioassay for Rapid and Accurate Analysis of Arsenic in Highly Variable Groundwater Samples. Environ Sci Technol 39:7625–7630
- Trott D, C. Dawson JJ, S. Killham K, et al (2007) Comparative evaluation of a bioluminescent bacterial assay in terrestrial ecotoxicity testing. J Environ Monit 9:44–50 . doi: 10.1039/B613734B
- van der Lelie D, Regniers L, Borremans B, et al (1997) The VITOTOX test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics. Mutat Res 389:279–290
- Veyrier FJ, Boneca IG, Cellier MF, Taha M-K (2011) A Novel Metal Transporter Mediating Manganese Export (MntX) Regulates the Mn to Fe Intracellular Ratio and Neisseria meningitidis Virulence. PLOS Pathog 7:e1002261 . doi: 10.1371/journal.ppat.1002261
- Wang A, Crowley DE (2005) Global Gene Expression Responses to Cadmium Toxicity in Escherichia coli. J Bacteriol 187:3259–3266 . doi: 10.1128/JB.187.9.3259-3266.2005
- Wang W, Lampi MA, Huang X-D, et al (2009a) Assessment of mixture toxicity of copper, cadmium, and phenanthrenequinone to the marine bacterium Vibrio fischeri. Environ Toxicol 24:166–177 . doi: 10.1002/tox.20411
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009b) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 10:57. doi: 10.1038/nrg2484
- Watson A, Mazumder A, Stewart M, Balasubramanian S (1998) Technology for microarray analysis of gene expression. Curr Opin Biotechnol 9:609–614 . doi: 10.1016/S0958-1669(98)80138-9
- Wei W, Liu X, Sun P, et al (2014) Simple whole-cell biodetection and bioremediation of heavy metals based on an engineered lead-specific operon. Environ Sci Technol 48:3363–3371 . doi: 10.1021/es4046567
- Wong YS, Tam NFY, Lau PS, Xue XZ (1995) The toxicity of marine sediments in Victoria Harbour, Hong Kong. Mar Pollut Bull 31:464–470 . doi: 10.1016/0025-326X(96)81927-8
- World Health Organization (2008) Guidelines for drinking-water quality Volume 1: Recommendations, Third
- Wu L, Thompson DK, Liu X, et al (2004) Development and Evaluation of Microarray-Based Whole-Genome Hybridization for Detection of Microorganisms within the Context of Environmental Applications. Environ Sci Technol 38:6775–6782 . doi: 10.1021/es049508i
- Yagur-Kroll S, Bilic B, Belkin S (2010) Strategies for enhancing bioluminescent bacterial sensor performance by promoter region manipulation. Microb Biotechnol 3:300–310 . doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00149.x
- Yamamoto K, Ishihama A (2005) Transcriptional response of Escherichia coli to external copper. Mol Microbiol 56:215–227 . doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04532.x
- Yoon KP, Silver S (1991) A second gene in the Staphylococcus aureus cadA cadmium resistance determinant of plasmid pl258. J Bacteriol 173:7636–7642 . doi: 10.1128/jb.173.23.7636-7642.1991

- Yu H, Chu L, Misra TK (1996) Intracellular inducer Hg2+ concentration is rate determining for the expression of the mercury-resistance operon in cells. J Bacteriol 178:2712–2714
- Zahid N, Zulfiqar S, Shakoori AR (2012) Functional analysis of cus operon promoter of Klebsiella pneumoniae using E. coli lacZ assay. Gene 495:81–88 . doi: 10.1016/j.gene.2011.12.040
- Zammit CM, Quaranta D, Gibson S, et al (2013) A Whole-Cell Biosensor for the Detection of Gold. PLoS ONE 8:e69292 . doi: 10.1371/journal.pone.0069292
- Zaslaver A, Bren A, Ronen M, et al (2006) A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for Escherichia coli. Nat Methods 3:623–628 . doi: 10.1038/nmeth895
- Zhang X, Wiseman S, Yu H, et al (2011) Assessing the toxicity of naphthenic acids using a microbial genome wide live cell reporter array system. Environ Sci Technol 45:1984–1991 . doi: 10.1021/es1032579
- Zhou J (2003) Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. Curr Opin Microbiol 6:288–294 . doi: 10.1016/S1369-5274(03)00052-3
- Zhou J, Thompson DK (2002) Challenges in applying microarrays to environmental studies. Curr Opin Biotechnol 13:204–207. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00319-1





Thèse de Doctorat

Anna HUA

Détection et évaluation de la contamination métallique dans des échantillons environnementaux complexes

Detection and evaluation of metallic contamination in complex environmental samples

Résumé

Dans le but de caractériser la pollution métallique dans l'environnement, seules des analyses chimiques exhaustives sont réalisées. Alors que celles-ci sont sensibles et spécifiques, le manque d'informations concernant la biodisponibilité des polluants présents rend l'information incomplète. Pour remédier à ce problème, des bactéries détectrices ont été développées. Permettant la quantification de la fraction biodisponible d'un polluant et l'évaluation de la toxicité associée, ces bioessais ont largement été utilisés au cours des deux dernières décennies. Cependant, malgré les avantages de cette technique, les études reportent leur manque de spécificité, limitant ainsi leurs applications environnementales.

Cette thèse cherche à établir une méthodologie d'analyse complète en vue de l'étude de la contamination métallique à destination d'échantillons environnementaux. Tout d'abord, des bioessais ont été développés pour la détection de trois métaux. Pour pallier la faible spécificité de ces souches, une analyse transcriptomique à l'échelle du génome de la bactérie E. coli a aussi été réalisée. Suite à l'établissement et à la validation de la méthodologie d'analyse d'importants jeux de données, des profils de réponse transcriptomiques spécifiques de (i) la présence de métal et de (ii) la concentration en métal ont été établis. Ceux-ci permettent de détecter les métaux et de quantifier la toxicité associée à la présence de mélanges de métaux dans divers environnements. Enfin, par le développement et le couplage des analyses biologiques et chimiques, nous avons mis en évidence le potentiel de cette méthode pour une caractérisation complète des pollutions environnementales.

Mots clés

bactéries bioluminescentes et fluorescentes, bioessai, analyse transcriptomique, métaux, matrices environnementales complexes

Abstract

In order to characterize the metallic pollution in the environment, only exhaustive chemical analyzes are performed. While these analyses are sensitive and specific, the lack of information on the bioavailability of pollutants makes this characterization incomplete. To address this problem, biosensing bacteria have been developed. Allowing the quantification of the bioavailable fraction of a pollutant and the evaluation of the associated toxicity, these bioassays have been widely used during the last two decades. However, despite the advantages of this technique, many studies have reported their lack of specificity, limiting their use for environmental applications.

This thesis aims to establish a complete methodology of analysis for metallic contamination of environmental samples. In the first part, bioassays were developed for the detection of three metals. To overcome the low specificity of these strains, genome-wide transcriptomic analysis of *E. coli* bacterium was also performed. Following the establishment and the validation of the methodology for large datasets analyzes, specific transcriptomic response profiles dedicated to (*i*) the presence of metal and (*ii*) their concentrations were established. These profiles allow the detection of mixed metals in various environmental matrices. Thus, through the development and coupling of biological and chemical analyzes, we have highlighted the potential of this method for a complete characterization of environmental pollution.

Key Words

bioluminescent and fluorescent bacteria, bioassay, transcriptomics, metals, complex environmental matrices