

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE • SCIENCES POUR L'INGENIEUR, GEOSCIENCE ET ARCHITECTURE  
(SPIGA)

Année 2011



# Développement d'une méthodologie d'analyse de données par arbre de décision appliquée à un biocapteur multicanal.

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Génie des procédés

Spécialités : Biocapteurs bactériens, biotechnologies et statistiques

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Sullivan JOUANNEAU**

*Le 8 mars 2011, devant le jury ci-dessous*

Président Jean-Claude AMIARD  
Rapporteurs Philippe GARRIGUES  
Jean-Louis MOREL  
Examineurs Jean-Claude AMIARD  
Eric THYBAUD  
Gérald THOUAND  
Marie-José DURAND-THOUAND

*Directeur de thèse : M. Gérald THOUAND, professeur • Université de Nantes  
Co-encadrant : Mme Marie-José DURAND-THOUAND, maître de conférence • Université de Nantes  
ED : SPIGA*

Développement d'une méthodologie d'analyse de données par arbre de décision appliquée à un biocapteur multicanal.

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

---

**ÉCOLE DOCTORALE • SCIENCES POUR L'INGENIEUR, GEOSCIENCE ET ARCHITECTURE  
(SPIGA)**

Année 2011

Développement d'une méthodologie d'analyse de  
données par arbre de décision appliquée à un  
biocapteur multicanal.

---

**THÈSE DE DOCTORAT**

Discipline : Génie des procédés

Spécialités : Biocapteurs bactériens, biotechnologies et statistiques

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Sullivan JOUANNEAU**

*«On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison.»*

[Henri Poincaré]

## Remerciements

---

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une bourse de la Ville de la Roche sur Yon au sein du laboratoire CBAC, UMR CNRS 6144 GEPEA de l'Université de Nantes.

Je tiens tous d'abord à remercier mes encadrants Gérald THOUAND, Professeur des Universités et Marie-José DURAND-THOUAND, Maître de conférence pour m'avoir accordé leur confiance durant toutes ces années.

Merci à mon jury de thèse, Philippe GARRIGUES et Jean-Louis MOREL rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'Eric THYBAUD pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Je tiens également à remercier particulièrement Jean-Claude AMIARD, président du jury, pour le temps qu'il m'a accordé dans le cadre de mes dosages physico-chimiques.

Je remercie Philippe Courcoux de l'ONIRIS pour sa contribution à l'élaboration des plans d'expériences mise en œuvre dans cette thèse.

Je tiens à remercier Hervé Capiaux, Sébastien Tesson, Virginie Langlois et Lionel Boiroux pour les nombreux cafés qu'ils m'ont généreusement offert au cours de ces trois dernières années ainsi que Kitty Amstrong pour sa bonne humeur constante à la cafétéria de l'IUT.

Merci à l'ensemble des doctorants (ex et futur) que j'ai côtoyé durant cet thèse : Hervé Gueuné pour l'ensemble des conseils qu'il m'a promulgué ainsi que la rigueur de travail qu'il m'a transmis, Mahmoud Affi, pour les grandes discussions parfois très animées sur de nombreux sujets divers et variés et enfin Ali Assaf pour m'avoir supporté durant tous ce temps.

Je tiens à remercier les stagiaires qui ont contribué à ces travaux : Laure Viaud et Cédric Brémand.

Un grand merci à Bernard Vrignaud, technicien de l'IUT, pour l'ensemble de ces conseils avisés, ses idées ingénieuses et son sens pratique qui m'ont permis de gagner un temps précieux dans le cadre de ce projet.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de ma famille qui m'ont soutenu et encouragé durant ces trois années : Maman, Papa, Wil', Tiz', mon Nain, Alain, Ginette, Marie, Adrien (plus récemment), Papy, Mamy,...

Merci à mon pote : Gwen, rencontré au laboratoire, et avec qui j'ai passé une formidable (mais trop courte) année bercée entre la recherche, le pastis et les longues soirées d'hiver.

Enfin je tiens à dire un ENORME merci à ma Loute, pour m'avoir apporté, tout au long de ces trois ans mais aussi des six années précédentes, amour, soutien, patience, compréhension (et il en faut quant on part au labo à 4h du matin pour changer une bouteille oubliée), ...Si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi grâce à toi. Pour tous cela, je te remercie et te dédie ce manuscrit.

A Sandra.

*« Et que la science brille ! »*

[Gérald THOUAND]

## Résumé

---

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du développement de systèmes alternatifs pour la gestion des pollutions métalliques dans l'environnement au moyen de biocapteurs bactériens bioluminescents. Ces systèmes permettent de quantifier la fraction biodisponible d'un polluant mais également d'évaluer sa toxicité.

Malgré les intérêts analytiques que présentent ces nouveaux outils biologiques, certains verrous ralentissent leurs développements. En effet, les nombreuses études publiées sur l'utilisation de souches bactériennes inductibles mettent en évidence la faible spécificité de ces capteurs biologiques rendant ainsi l'interprétation des résultats particulièrement délicate. Aussi, la première partie abordée au cours de ces travaux visait à améliorer la lecture des données en proposant un modèle d'aide à l'interprétation associant réponse bactérienne et analyse statistique.

D'autre part, le nombre de biocapteurs bactériens bioluminescents recensés reste assez limité et pour beaucoup d'entre eux, le développement se restreint à l'étude de la faisabilité sans caractérisation pertinente des performances ni applications à l'environnement. La seconde partie abordée visait à éclaircir ce point au travers du biocapteur Lumisens III.

Les résultats obtenus au travers de ces 2 premières parties, nous ont orienté vers le développement d'un nouveau système d'analyse innovant : Lumisens IV. Ainsi, associé au modèle statistique d'analyse par arbre de décision, ce biocapteur est le premier outil de suivi en ligne de pollution intégrant un système d'aide à l'interprétation.

**MOTS CLES :** Biocapteur bactérien bioluminescent, métaux, mélange, analyse de données, arbre de décision, gestion environnementale.

## Abstract

---

The framework of this thesis was the development of alternative systems for the monitoring of metallic pollutions into the environment with bioluminescent bacterial biosensors. These biosystems allow both to quantify the bioavailable fraction of a pollutant and to estimate its toxicity.

In spite of the analytical interests which present these new biological tools, several problems slow down their developments. Indeed, the numerous studies published on the use of inducible bacterial strains underline the low specificity of these biological sensors. Consequently the interpretation of result is particularly complex. So, the first objective of this study was to improve the data reading by proposing a model to simplify the data interpretation. This approach is based on the association of bacterial answers and statistical analysis.

Furthermore, the number of bioluminescent bacterial listed biosensors remains relatively limited and for a lot of them, their developments limit themselves to a feasibility study without relevant characterization of the performances nor the applications to the environment. The second part aimed at clearing up this point through the biosensor Lumisens III.

The results obtained through these two first parts, directed us to the development of a new innovative system of analysis: Lumisens IV. So, associated with the statistical model of analysis by decision tree, this biosensor is the first tool for on-line monitoring of pollution integrating a system for data interpretation.

**KEY WORDS :** Bioluminescent bacterial biosensor, metals, mixture, data analysis, decision tree, environmental monitoring

## Table des matières

---

<b><i>Productions scientifiques</i></b> .....	<b>1</b>
<b>Publications scientifiques</b> .....	<b>1</b>
<b>Congrès avec comité de lecture</b> .....	<b>1</b>
<b>Communications par posters</b> .....	<b>1</b>
<b><i>Liste des figures</i></b> .....	<b>3</b>
<b><i>Liste des tableaux</i></b> .....	<b>7</b>
<b><i>Liste des abréviations</i></b> .....	<b>9</b>
<b><i>Introduction</i></b> .....	<b>10</b>
<b><i>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</i></b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Généralités sur les métaux lourds</b> .....	<b>13</b>
1.1.1. Définition, utilisations et sources de pollution des eaux .....	13
1.1.2. Réglementation et toxicité de ces composés .....	15
1.1.3. Méthodes d'analyses .....	16
1.1.3.1. Méthodes physico-chimiques.....	16
1.1.3.2. Méthodes biologiques .....	19
1.1.3.3. Avantages et inconvénients des deux méthodes .....	22
<b>1.2. Biocapteur bactérien et bioéléments</b> .....	<b>23</b>
1.2.1. Promoteurs inductibles .....	24
1.2.2. Systèmes rapporteurs.....	25
1.2.3. Bioluminescence bactérienne .....	27
1.2.4. Réaction biochimique de la bioluminescence bactérienne.....	27
1.2.5. Génétique de la bioluminescence .....	28
1.2.6. Paramètres influençant la bioluminescence bactérienne .....	28
1.2.7. Exemples de biocapteurs bactériens bioluminescents.....	29
1.2.7.1. Biocapteurs bactériens en phase liquide .....	29
1.2.7.2. Biocapteurs bactériens en phase immobilisée.....	31
• Principes d'immobilisation .....	31
• Exemple de biocapteurs bactériens optiques en phase immobilisée .....	33
• Avantages/inconvénients des biocapteurs bactériens en phase immobilisés ...	35
1.2.8. Conclusions sur les biocapteurs bactériens .....	36
<b>1.3. Interprétation des données biologiques de bioluminescence</b> .....	<b>36</b>
1.3.1. Arbre de décision : principe général .....	40
1.3.2. Algorithme d'induction des arbres de décision.....	41

1.3.3.	Limites de l'approche par arbres de décision.....	42
<b>1.4.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>43</b>
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....</b>		<b>45</b>
<b>2.1.</b>	<b>Biocapteur : Lumisens III.....</b>	<b>46</b>
2.1.1.	Carte multi-puits.....	46
2.1.1.1.	Carte 1 : Multi-canal .....	47
2.1.1.2.	Carte 2 : Mono-canal .....	48
2.1.2.	Suivi de l'oxygène consommé par les bactéries.....	48
2.1.3.	Stérilisation du matériel .....	49
2.1.4.	Installation du circuit fluide.....	50
2.1.5.	Immobilisation des bactéries au sein de la carte de mesure.....	51
2.1.6.	Capture et analyse de la bioluminescence bactérienne.....	51
<b>2.2.</b>	<b>Plasmides et souches bactériennes .....</b>	<b>52</b>
2.2.1.	Stratégie de construction du plasmide pBMerlux .....	52
2.2.2.	Plasmides utilisés .....	53
2.2.3.	Souches bactériennes.....	53
<b>2.3.</b>	<b>Milieux de culture, antibiotique, produits chimiques et échantillons environnementaux .....</b>	<b>54</b>
2.3.1.	Milieu de culture .....	54
2.3.2.	Antibiotique.....	54
2.3.2.1.	Ampicilline .....	54
2.3.3.	Produits chimiques .....	55
2.3.3.1.	Solutions métalliques .....	55
2.3.3.2.	Solution de saccharose.....	55
2.3.3.3.	Solution de MgSO <sub>4</sub> .....	56
2.3.4.	Echantillons environnementaux .....	56
2.3.4.1.	Prélèvement et mesure in situ .....	56
2.3.4.2.	Préparation d'échantillons contaminés .....	56
2.3.4.3.	Conservation des échantillons.....	56
2.3.4.4.	Dosage chimique des métaux dans les échantillons environnementaux.....	57
<b>2.4.</b>	<b>Cultures bactériennes et conservation .....</b>	<b>57</b>
2.4.1.	Isolement et conservation sur boîtes de pétri .....	57
2.4.2.	Pré-culture bactériennes .....	57
2.4.3.	Culture des bactéries .....	58
2.4.4.	Conservation des souches à - 80°C .....	58
<b>2.5.</b>	<b>Méthode de suivi de la croissance bactérienne .....</b>	<b>59</b>
2.5.1.	Mesure de l'absorbance.....	59
2.5.2.	Méthode des UFC (Unité Formant Colonie).....	59
<b>2.6.</b>	<b>Cinétique de croissance bactérienne.....</b>	<b>59</b>

2.6.1.	Cinétique de croissance bactérienne en phase liquide (homogène) .....	59
2.6.2.	Cinétique de croissance bactérienne en phase immobilisée (hétérogène).....	59
<b>2.7.</b>	<b>Transformation des bactéries avec des plasmides.....</b>	<b>60</b>
2.7.1.	Purification des plasmides.....	60
2.7.2.	Mise en compétence des bactéries.....	61
2.7.3.	Transformation des bactéries compétentes.....	61
2.7.4.	Criblages des clones recombinants .....	61
<b>2.8.</b>	<b>Lyophilisation des bactéries en microplaques.....</b>	<b>62</b>
<b>2.9.</b>	<b>Essai d'induction en microplaque : bioessai.....</b>	<b>62</b>
2.9.1.	Essai d'induction avec des bactéries en phase liquide .....	62
2.9.2.	Essai d'induction avec des bactéries lyophilisées .....	63
2.9.3.	Traitement des données brutes de bioluminescence.....	63
<b>2.10.</b>	<b>Analyse descriptive des données collectées et développement des arbres de décisions .....</b>	<b>64</b>
2.10.1.	Construction d'une matrice de données : plan d'expérience.....	64
2.10.2.	Analyses descriptives : Analyses factorielles discriminantes .....	64
2.10.3.	Développement des arbres de décisions.....	65
2.10.3.1.	Répartition aléatoire des données : jeu d'apprentissage et jeu d'évaluation.....	65
2.10.3.2.	Logiciel SIPINA .....	65
2.10.3.3.	Logiciel Metalsoft développé dans le cadre du projet .....	66
2.10.4.	Validation des arbres de décision sur des échantillons de l'environnement. ...	66
<b>2.11.</b>	<b>Ingénierie du biocapteur hybride : bioessai en continu.....</b>	<b>66</b>
<b><i>Chapitre 3 : Caractérisation des souches bactériennes et mise au point de la méthode de détection de métaux lourds.....</i></b>		<b>68</b>
<b>3.1.</b>	<b>Construction des souches bactériennes inductibles bioluminescentes.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.</b>	<b>Effet de la phase de croissance sur l'induction de la bioluminescence des souches bactériennes .....</b>	<b>69</b>
3.2.1.	Effet de la phase de croissance sur les souches bactériennes inductibles .....	70
3.2.2.	Effet de la phase sur la souche bactérienne constitutive ( <i>E.coli</i> DH1 pBTaclux) .....	71
<b>3.3.</b>	<b>Spécificités des souches inductibles.....</b>	<b>72</b>
<b>3.4.</b>	<b>Phénomène d'interaction.....</b>	<b>74</b>
<b>3.5.</b>	<b>Effet de la lyophilisation sur la détection des métaux. ....</b>	<b>74</b>
3.5.1.	Bactéries fraîches versus bactéries lyophilisées .....	74
3.5.2.	Effet de la conservation des bactéries lyophilisées sur la détection des métaux.. ..	75

3.5.3. Etude de la sensibilité et de la spécificité des souches bactériennes sous forme lyophilisées .....	76
<b>3.6. Conclusion .....</b>	<b>77</b>
<b><i>Chapitre 4 : Développement d'un modèle statistique par arbre de décision pour l'aide à l'interprétation des données .....</i></b>	<b>78</b>
<b>4.1. Détermination des gammes de détection et des concentrations représentatives.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2. Acquisition des données.....</b>	<b>80</b>
<b>4.3. Analyses descriptives des données .....</b>	<b>81</b>
4.3.1. Analyses des données brutes .....	82
4.3.2. Analyses des données pré-traitées .....	84
<b>4.4. Développement des arbres de décision.....</b>	<b>84</b>
4.4.1. Mise en œuvre du logiciel SIPINA pour le développement des premiers modèles d'arbre de décision. ....	86
4.4.2. Développement d'un logiciel dédié à l'identification de métaux au laboratoire « Metalsoft ».....	89
<b>4.5. Validation des arbres de décision sur des matrices environnementales .....</b>	<b>92</b>
<b>4.6. Conclusion .....</b>	<b>94</b>
<b><i>Chapitre 5 : Caractérisation biologique du biocapteur LUMISENS III.....</i></b>	<b>95</b>
<b>5.1. Stabilité du système dans le temps.....</b>	<b>97</b>
5.1.1. Etude du fonctionnement du biocapteur Lumisens III avec la souche <i>E.coli</i> K12 MG1655 pBMerlux : promoteur extra-cellulaire. ....	98
5.1.1.1. Simulation de pollution quotidienne par du mercure.....	98
5.1.1.2. Simulation de pollution ponctuelle par du mercure.....	101
5.1.2. Etude du fonctionnement du biocapteur Lumisens III avec la souche <i>E.coli</i> MG1655 pBZntlux : promoteur intracellulaire .....	102
<b>5.2. Utilisation du biocapteur Lumisens III en conditions environnementales .....</b>	<b>103</b>
5.2.1. Influence des conditions environnementales sur la détection .....	103
5.2.1.1. Cas d'une eau de sortie de station d'épuration préalablement stérilisée.....	103
5.2.1.2. Cas d'une eau de sortie de station d'épuration non stérilisée .....	104
5.2.2. Risques liés à l'utilisation du biocapteur Lumisens III sur l'environnement.	105
<b>5.3. Conclusion.....</b>	<b>106</b>
<b><i>Chapitre 6 : Développement d'un système hybride biocapteur/bioessai pour le suivi de pollution métallique .....</i></b>	<b>108</b>
<b>6.1. Ingénierie du biosystème : Lumisens IV .....</b>	<b>109</b>

6.1.1.	Conception assisté par ordinateur .....	109
6.1.1.1.	Circulation des fluides .....	109
6.1.1.2.	Chambre de mesure.....	110
	• Enceinte thermostatée et étanche à la lumière extérieure.....	110
	• Système de capture de bioluminescence bactérienne.....	111
	• Organisation générale de la chambre de mesure .....	112
6.1.1.3.	Vue d'ensemble du biocapteur Lumisens IV avant l'étape de construction .....	113
6.1.2.	Construction du nouveau système .....	113
<b>6.2.</b>	<b>Procédure d'utilisation de Lumisens IV.....</b>	<b>115</b>
6.2.1.	Séquence d'exposition.....	115
6.2.2.	Traitement des données .....	115
<b>6.3.</b>	<b>Caractérisation du biocapteur Lumisens IV .....</b>	<b>115</b>
6.3.1.	Stabilité du système dans le temps (conditions de laboratoire) .....	115
6.3.2.	Stabilité du système dans le temps (en conditions environnementales).....	117
<b>6.4.</b>	<b>Suivi de pollution à l'aide du biosystème Lumisens IV couplé au module d'analyse des données du logiciel Metalsoft.....</b>	<b>119</b>
6.4.1.	Calibration du système .....	119
6.4.2.	Détection d'un évènement de pollution environnementale par Lumisens IV et interprétation des données via le logiciel Metalsoft. ....	120
6.4.3.	Conclusion.....	121
<b><i>Discussion</i></b>	<b>.....</b>	<b>122</b>
1.	Développement d'un outil d'analyse des réponses des bioéléments bactériens ....	123
2.	Compréhension biologique du biocapteur Lumisens III .....	124
3.	Développement d'un système de suivi en ligne des pollutions métalliques intégrant un outil d'analyse des données : Lumisens IV .....	125
<b><i>Perspectives</i></b>	<b>.....</b>	<b>127</b>
<b><i>Références bibliographiques</i></b>	<b>.....</b>	<b>129</b>

## Productions scientifiques

---

### *Publications scientifiques*

**Jouanneau S.**, Durand MJ., Courcoux P., Blusseau T. et Thouand G. « Improvement of the identification of four heavy metals in environmental samples by using predictive decision tree models coupled with a set of five bioluminescent bacteria. » *Environmental Science & Technology*, 2011

**Jouanneau S.**, Durand MJ., et Thouand G. « Développement de biocapteurs bactériens optiques pour la détection de métaux dans l'environnement », *REE*, N°1, p 24-33, 2011.

Charrier T., Durand M.J., Affi M., **Jouanneau S.**, Gezekel H. et Thouand G. « Bacterial Bioluminescent Biosensor Characterisation for On-line Monitoring of Heavy Metals Pollutions in Waste Water Treatment Plant Effluents », *Biosensors*, INTECH, p179-206, 2010.

Charrier T., Durand M.J., **Jouanneau S.**, Dion M., Perneti M., Poncelet et D., Thouand G., « 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*, 2010.

**Jouanneau S.**, Durand MJ, Capioux H, Charrier T, Courcoux P, Picart P, Daniel P et Thouand G. « Développement d'un biocapteur bactérien optique pour l'identification de métaux lourds dans l'environnement. », 5e colloque interdisciplinaire en instrumentation C2I 2010, Hermès, 2010.

### *Congrès avec comité de lecture*

**Jouanneau S.**, Durand M.J., Capioux H., Charrier T., Courcoux P. and Thouand G. « Development of an identification model of heavy metals by decision tree applied in a multi-channel biosensor. » 14th International Symposium on Toxicity Assessment. Metz-FRANCE, 1-4 septembre 2009.

**Jouanneau S.**, Durand M.J., Capioux H., Charrier T., Courcoux P., Picart P., Daniel P. and Thouand G. « Développement d'un biocapteur bactérien optique pour l'identification de métaux lourds dans l'environnement. » 5<sup>ème</sup> Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation, Le Mans-FRANCE, 26-27 janvier 2010.

### *Communications par posters*

**Jouanneau S.**, Arce J., Affi M., Vrignaud B., Thouand G. « Technological conception of an automated biosystem to the monitoring of pollution in water samples. » Euroanalysis 2009, Innsbruck-AUTRICHE, 6-10 septembre 2009

**Jouanneau S.**, Durand M.J., Capioux H., Charrier T. et Thouand G. « Biological method for the monitoring of heavy metals in water : Development of decision trees with an array of five

bacterial strains included in a biosensor. » Colloque National Adebitech 2009, Paris-FRANCE, 20-22 octobre 2009

**Jouanneau S.**, Durand M.J., Capioux H., Charrier T., Courcoux P. et Thouand G. « Développement d'arbres de décision pour l'identification de métaux lourds basés sur 5 souches bactériennes intégrées dans un biocapteur optique. » Journée BIOANALYSE 2009, Nantes-FRANCE, 19 novembre 2009.

**Jouanneau S.**, Thouand G. et Durand M.J. « Développement d'outils biologiques analytiques pour la détection de composés métalliques et organo-métalliques. » Colloque 2010 de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Versailles-Grignon-FRANCE, 31 mars-1 avril 2010.

## Liste des figures

---

<b>FIGURE 1 :</b> SECTEURS INDUSTRIELS UTILISANT DU MERCURE. ETUDE REPERTORIANANT LES ACTIVITES EN 2002 (MEDD 2002). .....	13
<b>FIGURE 2 :</b> ILLUSTRATION DES NOTIONS DE BIODISPONIBILITE ET DE BIOACCESSIBILITE (SEMPLE <i>ET AL.</i> 2004).....	19
<b>FIGURE 3 :</b> PRINCIPE ET PHOTOGRAPHIE DU KIT IMMUNO-CHROMATOGRAPHIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN CADMIUM.....	21
<b>FIGURE 4 :</b> SCHEMA DE PRINCIPE D'UN BIOCAPTEUR BACTERIEN.....	23
<b>FIGURE 5 :</b> MECANISME DE DETECTION SPECIFIQUE PAR DES BACTERIES MODIFIEES.....	24
<b>FIGURE 6 :</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE EN TROIS DIMENSIONS DE LA LUCIFERASE BACTERIENNE DE <i>VIBRIO HARVEYI</i> . (FISHER <i>ET AL.</i> 1996).....	27
<b>FIGURE 7 :</b> RELATION ENTRE REACTION DE BIOLUMINESCENCE BACTERIENNE, GENES ET ENZYMES LIES A L'OPERON <i>LUX</i> .....	28
<b>FIGURE 8 :</b> REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BIOCAPTEUR MULTICANAL EN PHASE LIQUIDE DEVELOPPE PAR GU ET GIL (2001).....	30
<b>FIGURE 9 :</b> STRUCTURE EN RESEAU D'UN HYDROGEL D'AGAROSE A 2% (AFFI 2009). .....	32
<b>FIGURE 10 :</b> SCHEMAS ET PHOTOGRAPHIES DE BIOCAPTEURS OPTIQUES REPOSANT SUR DES CAPTEURS BIOLOGIQUES IMMOBILISES.....	34
<b>FIGURE 11 :</b> DETECTION D'UN MELANGE DE CADMIUM (500NM) ET D'ARSENIC (5 $\mu$ M) DANS LE BIOCAPTEUR LUMISENS III .....	35
<b>FIGURE 12 :</b> SPECIFICITE DES DIFFERENTS CAPTEURS BACTERIENS EXPOSES A DES METAUX LOURDS (IVASK <i>ET AL.</i> 2009). .....	37
<b>FIGURE 13 :</b> INTERPRETATION DES DONNEES DE BIOLUMINESCENCE OBTENUE A PARTIR D'UN ECHANTILLON INCONNU. ....	37
<b>FIGURE 14 :</b> DISCRIMINATION DU PARAQUAT (20MG/L) ET DU PARATHION (500MG/L) BASEE SUR DEUX CAPTEURS BACTERIENS <i>E. COLI ORAA'::LUXCDABE</i> ET <i>LACZ'::LUXCDABE</i> GRACE A LA THEORIE DE DECISION BAYESIENNE.....	38
<b>FIGURE 15 :</b> EMPREINTE BIOLUMINESCENTE DU POTASSIUM CYANIDE - 20MG/L-(TRAIT BLEU POINTILLE : MILIEU DE LABORATOIRE, PLEIN : EAU BRUTE) ET DU PARAQUAT -31.25MG/L- (TRAIT ROUGE POINTILLE : MILIEU DE LABORATOIRE, PLEIN : EAU BRUTE) EN FONCTION DES BIOELEMENTS RAPPORTEURS.....	38
<b>FIGURE 16 :</b> REPRESENTATIONS GRAPHIQUES ET LEURS EFFICACITES D'IDENTIFICATION EN FONCTION DES METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES (DONNEES TRAITEES DANS LE CADRE DE CETTE THESE).....	40

<b>FIGURE 17 :</b>	CONSTITUANTS D'UN ARBRE DE DECISION .....	41
<b>FIGURE 18 :</b>	PHENOMENES DE SOUS-AJUSTEMENT ET SUR-AJUSTEMENT DES MODELES : ARBITRAGE ENTRE TAUX D'ERREUR ET COMPLEXITE (ADAPTEE DE RAKOTOMALALA, 2005). .....	43
<b>FIGURE 19 :</b>	SCHEMA GENERAL DU BIOCAPTEUR LUMISENS III.....	46
<b>FIGURE 20 :</b>	PLAN DE LA CARTE MULTI-CANAL (COTES EN MILLIMETRES) . VUE DE DESSUS, COUPE TRANSVERSALE D'UN CANAL (COUPE A-A) ET VUE DETAILLEE D'UN Puits (DETAIL B). .....	47
<b>FIGURE 21 :</b>	CARTE MULTI-CANAL DANS LES 2 CONFIGURATIONS .....	47
<b>FIGURE 22 :</b>	PLAN DE LA CARTE MONO-CANAL (COTES EN MILLIMETRES) . VUE DE DESSUS, COUPE TRANSVERSALE D'UN CANAL (COUPE A-A) ET VUE DETAILLEE D'UN Puits (DETAIL B). .....	48
<b>FIGURE 23 :</b>	MICROSONDE UTILISEE ET SYSTEME DEVELOPPE POUR LE SUIVI DE L'OXYGENE.....	49
<b>FIGURE 24 :</b>	SCHEMA DE MONTAGE DU CIRCUIT FLUIDIQUE POUR UNE CARTE MONO-CANAL. ....	50
<b>FIGURE 25 :</b>	STRATEGIE DE CLONAGE DU PLASMIDE PBMERLUX .....	52
<b>FIGURE 26 :</b>	PROCEDURE DE DENOMBREMENT DES BACTERIES EN PHASE IMMOBILISEE A PARTIR DE LA CARTE 1 DE LUMISENS III .....	60
<b>FIGURE 27 :</b>	MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENCES PAR CONVERSION DES FACTEURS D'INDUCTION EN LOGARITHME. (SOUCHE <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBARSLUX).....	63
<b>FIGURE 28 :</b>	PLASMIDES UTILISES POUR LA DETECTION DE METAUX SPECIFIQUES DANS LE CADRE DE CETTE THESE. ....	69
<b>FIGURE 29 :</b>	EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR LA DETECTION DES SOUCHES <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBZNTLUX, PBARSLUX, PBCOPLUX ET PBMERLUX (N=2). ....	70
<b>FIGURE 30 :</b>	CONSTRUCTION PLASMIDIQUE PBTACLUX ET EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR LA PRODUCTION DE BIOLUMINESCENCE DE LA SOUCHE <i>E. COLI</i> DH1 PBTACLUX. ....	71
<b>FIGURE 31 :</b>	METAUX DETECTES ET CONCENTRATIONS INDUISANT <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBZNTLUX, PBARSLUX, PBMERLUX, ET PBCOPLUX. ....	73
<b>FIGURE 32 :</b>	PHENOMENE D'INTERACTION OBSERVE ENTRE LE CADMIUM (25 $\mu$ M) ET LE CUIVRE (250 $\mu$ M) AVEC <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBCOPLUX.....	74
<b>FIGURE 33 :</b>	INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION SUR LA DETECTION DU CADMIUM, DE L'ARSENIC III, DU MERCURE ET DU CUIVRE, RESPECTIVEMENT, PAR <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBZNTLUX, PBARSLUX, PBMERLUX ET PBCOPLUX. ....	75
<b>FIGURE 34 :</b>	EFFET DU STOCKAGE A -20°C DES BACTERIES LYOPHILISEES SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE CHEZ <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBARSLUX. ....	76

<b>FIGURE 35 :</b> COURBE SPECIFIQUE D'INDUCTION, GAMMES DE CONCENTRATIONS ET CONCENTRATIONS REPRESENTATIVES POUR CHAQUE SOUCHE BACTERIENNE. ....	80
<b>FIGURE 36 :</b> ANALYSES FACTORIELLES DISCRIMINANTES OBTENUES POUR CHACUN DES METAUX A PARTIR DE LA MATRICE GLOBALE DE DONNEES (N=553). ....	83
<b>FIGURE 37 :</b> ANALYSES FACTORIELLES DISCRIMINANTES OBTENUES POUR CHACUN DES METAUX A PARTIR DE LA MATRICE REDUITE DE DONNEES (N=301) ....	85
<b>FIGURE 38 :</b> ANALYSES FACTORIELLES DISCRIMINANTES OBTENUES POUR LE MERCURE APRES FUSION DES CLASSES DE CONCENTRATION "0" ET "LD" (N=301) ....	86
<b>FIGURE 39 :</b> ARBRE DE DECISION DEVELOPPE AVEC LE LOGICIEL SIPINA POUR L'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DU CUIVRE .....	87
<b>FIGURE 40 :</b> LIMITE DU CALCUL DE LA VALEUR DU CRITERE DE SEGMENTATION MIS EN ŒUVRE PAR LE LOGICIEL SIPINA.....	88
<b>FIGURE 41 :</b> LIMITE DU CALCUL DE LA VALEUR DU CRITERE DE SEGMENTATION MIS EN ŒUVRE PAR LE LOGICIEL SIPINA.....	88
<b>FIGURE 42 :</b> COMPARAISON ENTRE LES TAUX D'EFFICACITE DE CLASSIFICATION D'ECHANTILLONS INCONNUS OBTENUS A PARTIR DES ARBRES CONÇUS AVEC SIPINA ET DES ARBRES CONÇUS AVEC METALSOFT. ....	89
<b>FIGURE 43 :</b> ARBRES DE DECISION SPECIFIQUES DU CUIVRE ET DE L'ARSENIC III DEVELOPPES PAR METALSOFT.....	90
<b>FIGURE 44 :</b> ARBRES DE DECISION SPECIFIQUES DU MERCURE ET DU CADMIUM DEVELOPPES PAR METALSOFT.....	91
<b>FIGURE 45 :</b> CAPTURE D'ECRAN DU MODULE D'ANALYSE INCLUS DANS LE LOGICIEL « METALSOFT ».....	92
<b>FIGURE 46 :</b> ETUDE DE FAISABILITE REALISEE AVEC LUMISENS III .....	97
<b>FIGURE 47 :</b> COURBE D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE <i>E.COLI</i> K12 MG1655 PBMERLUX DANS LE CAS D'UNE SIMULATION DE CONTAMINATION QUOTIDIENNE PAR DU MERCURE ET ANALYSES COMPLEMENTAIRES.....	99
<b>FIGURE 48 :</b> EFFET D'EXPOSITIONS ANTERIEURES AU MERCURE SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE <i>E.COLI</i> K12 MG1655 PBMERLUX DANS LUMISENS III.....	101
<b>FIGURE 49 :</b> COURBE D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE <i>E.COLI</i> K12 MG1655 PBZNTLUX DANS LE CAS D'UNE SIMULATION DE CONTAMINATION QUOTIDIENNE PAR DU CADMIUM. ....	102
<b>FIGURE 50 :</b> INFLUENCE D'UNE MATRICE ENVIRONNEMENTALE STERILE SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE CHEZ <i>E.COLI</i> K12 MG1655 PBMERLUX. ....	103

<b>FIGURE 51 :</b> INFLUENCE DES PARAMETRES BIOLOGIQUES D'UNE MATRICE ENVIRONNEMENTALE SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE CHEZ <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBMERLUX. ....	104
<b>FIGURE 52 :</b> EVALUATION DU RELARGAGE BACTERIEN DANS LE BIOCAPTEUR LUMISENS III. ....	106
<b>FIGURE 53 :</b> PHOTOGRAPHIE DE L'AUTOMATE DE MICRO-DISTRIBUTION : MICRO10X (ICI EN CONFORMATION AVEC 12 INJECTEURS POUR UNE DISTRIBUTION EN LIGNE). ....	109
<b>FIGURE 54 :</b> CIRCUIT FLUIDIQUE MIS EN ŒUVRE DANS LE BIOCAPTEUR LUMISENS IV. ....	110
<b>FIGURE 55 :</b> MODELISATION EN 3 DIMENSIONS DU SYSTEME DE CHAUFFAGE INTERNE A LUMISENS IV. ....	111
<b>FIGURE 56 :</b> CONFIGURATION DE CAPTURE DE LA BIOLUMINESCENCE PAR LA CAMERA CCD. ....	112
<b>FIGURE 57 :</b> ORGANISATION (VUE DE DESSUS) DE LA CHAMBRE DE MESURE DE LA BIOLUMINESCENCE. ....	112
<b>FIGURE 58 :</b> VUE D'ENSEMBLE DU MODELE 3D DE LUMISENS IV PREALABLE A LA CONSTRUCTION. ....	113
<b>FIGURE 59 :</b> PHOTOGRAPHIES DE QUELQUES ETAPES DE LA CONSTRUCTION DE LUMISENS IV. ....	114
<b>FIGURE 60 :</b> NIVEAU D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBMERLUX OBSERVE DANS LUMISENS III ET IV : CAS D'UNE EXPOSITION QUOTIDIENNE AU MERCURE. ....	116
<b>FIGURE 61 :</b> NIVEAU D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE <i>E. COLI</i> K12 MG1655 PBMERLUX OBSERVE DANS LUMISENS III ET IV : CAS D'UNE EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE QUOTIDIENNE AU MERCURE. ....	118
<b>FIGURE 62 :</b> COURBE D'ETALONNAGE ENTRE LES DEUX TRANSDUCTEURS PHOTOSENSIBLES UTILISES (PHOTOMULTIPLIFICATEUR ET CAMERA CCD)	119

## Liste des tableaux

---

<b>TABLEAU 1 :</b> PRINCIPALES SOURCES ANTHROPIQUES DE CONTAMINATION DES MILIEUX NATURELS PAR LES METAUX EN FRANCE (2002).....	14
<b>TABLEAU 2 :</b> CONCENTRATION UBIQUITAIRE DE PLUSIEURS METAUX DANS LE MILIEU « EAU DOUCE » .....	15
<b>TABLEAU 3 :</b> LIMITE DE QUALITE DES EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE EN FRANCE.....	16
<b>TABLEAU 4 :</b> DONNEE TOXICOLOGIQUE DES CERTAINS METAUX .....	17
<b>TABLEAU 5 :</b> CLASSIFICATION DES SUBSTANCES CANCEROGENES DES ORGANISMES DE CLASSIFICATION. ....	17
<b>TABLEAU 6 :</b> METHODES TRADITIONNELLES DE DOSAGE DES METAUX ET LIMITES DE DETECTION .....	18
<b>TABLEAU 7 :</b> METHODES CHIMIQUES ALTERNATIVES DE DOSAGE DES METAUX ET LIMITES DE DETECTION .....	19
<b>TABLEAU 8 :</b> QUELQUES EXEMPLES DE METHODES BIOLOGIQUES DE DOSAGE DES METAUX ET LIMITES DE DETECTION.....	20
<b>TABLEAU 9 :</b> QUELQUES EXEMPLES DE PROMOTEURS INDUCTIBLES AVEC LEURS CIBLES CHIMIQUES RESPECTIVES. ....	25
<b>TABLEAU 10 :</b> GENES ET SYSTEMES RAPPORTEURS UTILISES POUR LA CONSTRUCTION DE BIOELEMENTS BACTERIENS INDUCTIBLES. ....	26
<b>TABLEAU 11 :</b> RECAPITULATIF DES ELEMENTS COMPOSANT LE CIRCUIT FLUIDIQUE POUR UNE CARTE DE MESURE.....	50
<b>TABLEAU 12 :</b> PLASMIDES UTILISEES. ....	53
<b>TABLEAU 13 :</b> SOUCHES UTILISEES AU COURS DE LA THESE.....	53
<b>TABLEAU 14 :</b> COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES UTILISES AU COURS DE CES TRAVAUX .....	54
<b>TABLEAU 15 :</b> PREPARATION DES SOLUTIONS MERES DE METAUX LOURDS .. .....	55
<b>TABLEAU 16 :</b> CONDITION DE STOCKAGE ET PRE-TRAITEMENT DES ECHANTILLONS. ....	56
<b>TABLEAU 17 :</b> RECAPITULATIF DES CONDITIONS DE CULTURES DE SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES AU COURS DE CETTE THESE.....	58
<b>TABLEAU 18 :</b> METAUX TESTES ET LIMITES DE DETECTION OBSERVEES AVEC LES SOUCHES BACTERIENNES BIOLUMINESCENTES INDUCTIBLES... ..	72
<b>TABLEAU 19 :</b> METAUX TESTES ET LIMITES DE DETECTION OBSERVEES AVEC LES SOUCHES BACTERIENNES INDUCTIBLES SOUS FORME LYOPHYLISEES.....	77
<b>TABLEAU 20 :</b> EXTRAIT DE LA MATRICE GLOBALE COMPOSEE DES 553 DONNEES. ....	81

<b>TABLEAU 21 :</b> COMPARAISON ENTRE ANALYSES CHIMIQUES CONVENTIONNELLES ET ANALYSES PAR NOTRE SYSTEME BIO- STATISTIQUE. ....	93
<b>TABLEAU 22 :</b> CONDITIONS EXPERIMENTALES MISES EN OEUVRE DANS LA CARACTERISATION DE LUMISENS III ET IV .....	116
<b>TABLEAU 23 :</b> EFFICACITE DE PREDICTION POUR LE BIOCAPTEUR LUMISENS IV ASSOCIE AU LOGICIEL D'ANALYSE « METALSOFT » .....	120

## Liste des abréviations

---

Ac 1/10 : Milieu Acétate dilué 10 fois

Ac 1X : Milieu Acétate non dilué

AcG 1X : Milieu Acétate non dilué et Gélosé

CAO : Conception Assistée par Ordinateur

CART : Classification And Regression Tree

CHAID : CHi squared Automatic Interaction Detector

EDTA : Acide éthylène diamine tetra-acétique

ID3 : Induction of Decision Tree

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

LB : Milieu Luria-Bertani

LBG : Milieu Luria-Bertani Gélosé

MEDD : Ministère de l'écologie et du développement durable

R<sup>2</sup> : Taux de corrélation

RPM : Rotation Par Minute

UFC : Unité Formant Colonie

## Introduction

---

Pour répondre à la dégradation des ressources en eau du territoire, le Parlement Européen a édité, en 2000, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE). L'un de ces objectifs vise à évaluer et à surveiller la qualité de ces ressources notamment au travers du suivi de 33 substances prioritaires (annexe I, directive 2008/105/CE). Certains métaux lourds comme le plomb, le cadmium ou le mercure figurent parmi cette liste de composés à détecter.

Les outils conventionnels (méthodes physico-chimiques) pour la détection et la quantification des métaux en milieu aqueux, bien que particulièrement sensibles et spécifiques, n'apparaissent pas comme des moyens adéquats pour le suivi de pollution en ligne (coût, complexité) dans l'environnement. Aussi, afin de répondre aux objectifs fixés par la DCE, des équipes de recherche du monde entier ont développé de nouveaux outils alternatifs avec parmi eux, les biocapteurs optiques basés sur des bioéléments bioluminescents associés à un transducteur photosensible.

L'intérêt de ces systèmes réside dans la nature des bioéléments qui les composent (bactéries bioluminescentes). En effet, ils permettent de suivre le niveau de toxicité globale de l'effluent analysé mais s'attachent également à quantifier la fraction biodisponible des composés recherchés.

Toutefois, plusieurs verrous technologiques freinent le développement et la démocratisation de ces outils. Premièrement, la littérature scientifique consacrée à la caractérisation de ces bioéléments bactériens met en évidence leur faible spécificité. En effet, il apparaît que plusieurs composés (dans ce cas, des métaux) soient susceptibles d'être détectés par le même bioélément bactérien rendant l'interprétation des données particulièrement délicates. D'autre part, le nombre limité d'articles dédiés au développement de biocapteurs bactériens ne montrent pas de validations significatives de ces systèmes au travers d'applications environnementales.

Le laboratoire CBAC (Capteur Bactérien pour l'Analyse et le Contrôle, UMR CNRS GEPEA 6144, IUT de La Roche sur Yon) consacre, depuis une dizaine d'années, une part importante de ses travaux de recherche à l'élaboration de tels systèmes. Le biocapteur Lumisens III, développé et caractérisé au laboratoire au cours de deux thèses antérieures (T.Charrier, 2006 et M.Affi, 2009) est confronté aux mêmes verrous technologiques (faible spécificité et défaut de validation).

Par conséquent, les objectifs des travaux présentés dans cette étude sont de proposer des solutions aux verrous avancés. Face aux problèmes de faibles spécificités des bioéléments bactériens, nous proposons, dans une première partie, une approche statistique par arbre de décision reposant sur les réponses croisées de plusieurs souches bactériennes bioluminescentes. L'objectif étant d'améliorer la lecture des données en proposant un modèle d'aide à l'interprétation. Le modèle développé dans cette thèse s'appuie sur cinq souches bactériennes et vise à détecter quatre métaux en mélange (cadmium, arsenic III, mercure et cuivre).

Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à la question de l'absence de validation significative d'un biocapteur multicanal en phase immobilisée : Lumisens III. L'enjeu étant de déterminer avec précision les conditions limites d'utilisation de ce biosystème en laboratoire et dans le cadre d'applications environnementales.

Enfin les résultats recueillis lors des deux premières parties nous ont conduit au développement d'un nouveau système autonome de suivi des pollution, Lumisens IV, associant les avancés technologiques issues des recherches précédentes.

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

---

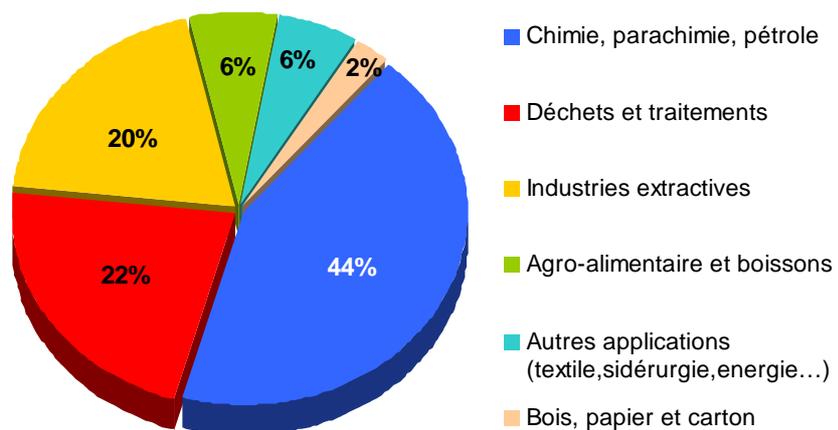
L'étude bibliographique menée au cours de cette thèse s'articule autour de plusieurs aspects relatifs à la détection de métaux lourds par les bactéries. Le premier point abordé concerne les risques que représentent les métaux lourds pour l'environnement et la santé publique ainsi que le cadre réglementaire et législatif relatif à ces polluants. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux différentes méthodes de détection de ces composés et plus particulièrement aux méthodes par biocapteurs bactériens. Enfin, la dernière étape de cette étude bibliographique concerne les technologies liées à la détection et à l'interprétation des résultats : bactéries bioluminescentes spécifiques et modèles prédictifs par arbre de décision.

## 1.1. Généralités sur les métaux lourds

### 1.1.1. Définition, utilisations et sources de pollution des eaux

« Les métaux lourds désignent un ensemble de métaux, de forte densité, souvent d'origine industrielle comme le mercure, le plomb ou le cadmium, qui peuvent se fixer dans la chaîne alimentaire et provoquer à certaines concentrations et à long terme des pathologies du système nerveux ou sanguin. » : définition donné par le Ministère français de la santé et des sports (<http://baignades.sante.gouv.fr>). Toutefois, l'appellation « métaux lourds » appartient au langage courant sans aucun fondement scientifique et sans application juridique. On appelle « métaux lourds », les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes<sup>1</sup>, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm<sup>3</sup>.

Ces composés sont utilisés dans de nombreuses industries. On retrouve notamment le cadmium dans la fabrication d'accumulateurs électriques, de pigments, de stabilisants pour les matières plastiques ou encore dans certains alliages (Pichard *et al.* 2005a). Le plomb est, quant à lui, utilisé principalement dans le secteur des batteries électriques. Cette industrie représente à elle seule 65 à 70 % des utilisations du plomb dans le monde occidental (Pichard *et al.* 2003). Le mercure est utilisé dans diverses activités industrielles comme le montre la figure 1.



**FIGURE 1 :** SECTEURS INDUSTRIELS UTILISANT DU MERCURE. ETUDE REPERTORIANT LES ACTIVITES EN 2002 (MEDD 2002).

<sup>1</sup> : Un métalloïde est un élément qui combine certaines caractéristiques du métal et d'autres caractéristiques opposées, l'absence de conductivité électrique par exemple. L'arsenic est un métalloïde (Kittel 1998).

**Mercurure (2002)**

Etablissement	Commune	Exutoire	Rejet (kg/an)
MDPA	Wittelsheim (68)	Rhin	70
Albemarle PPC	Vieux-Thann (68)	Thur	45
Atofina	Jarrie (38)	La Romanche	35
Atofina	Château-Arnoux (04)	Durance	25
Atofina Lavera	Lavera (13)	Mer	14

**Plomb (2002)**

Etablissement	Commune	Exutoire	Rejet (kg/an)
Aluminium Pechiney	Gardanne (13)	Méditerranée	19000
Metaleurop Nord	Noyelles-Godault (62)	Canal de Deûle	4000
LG Philips Displays France Dreux (28)		Le Brélan	3894
MDPA	Wittelsheim (68)	Rhin	2129
CEAC	Lille (59)	La Marque	740

**Cadmium (2002)**

Etablissement	Commune	Exutoire	Rejet (kg/an)
Metaleurop Nord	Noyelles-Godault (62)	Canal de Deûle	2263
Valdunes	Trith-Saint-Léger (59)	Escaut	150
Ugine et ALZ	Isbergues (62)	Le Guatbecque	90
Lafarge	Fos-sur-Mer (13)	Station de pompage	88
MDPA	Wittelsheim (68)	Rhin	70

**Arsenic (2002)**

Etablissement	Commune	Exutoire	Rejet (kg/an)
MDPA	Wittelsheim (68)	Rhin	3299
Grande Paroisse SA	Le Grand-Quevilly	Seine	801
Metaleurop Nord	Noyelles-Godault (62)	Canal de Deûle	577
Solvay Electrolyse France Tavaux (39)		Saône	175
Sollac Mardyck	Mardyck (59)	Bassin de Mardyck	140

**TABLEAU 1 :** PRINCIPALES SOURCES ANTHROPIQUES DE CONTAMINATION DES MILIEUX NATURELS PAR LES METAUX EN FRANCE (2002).

Source : Ministère de l'écologie et du développement durable - Principaux rejets industriels en FRANCE

Outre les rejets naturels de ces composés qui apparaissent sous l'effet de l'érosion des sols, la quasi-totalité des rejets de métaux lourds dans l'environnement provient de l'industrie. En effet, la proximité des fleuves a longtemps été un terrain privilégié à l'installation d'industries et ce pour trois raisons majeures : le transport de matières premières, l'alimentation en eau qui permet de refroidir les installations et la possibilité de rejeter des effluents industriels (tableau 1). Ainsi, durant plusieurs décennies, les fleuves ont été de véritables exutoires permettant l'évacuation des déchets liquides issues des activités industriels (Miquel 2001).

Le tableau suivant (tableau 2) est une liste non exhaustive des concentrations ubiquitaires pour certain de ces composés en eau douce.

**TABLEAU 2 : CONCENTRATION UBIQUITAIRE DE PLUSIEURS METAUX DANS LE MILIEU « EAU DOUCE »**

	Eaux de surface	Eaux de pluies	Référence
Plomb	1-10 µg/L	< 3 µg/L	(Pichard <i>et al.</i> 2003)
Mercure	0,01-12 ng/L	< 0,5-0,6 ng/L	(Pichard <i>et al.</i> 2006a)
Arsenic	< 10 µg/L	IND	(Pichard <i>et al.</i> 2006d)
Cuivre	1-10µg/L	IND	(Pichard <i>et al.</i> 2005b)
Cobalt	1-5 µg/L	IND	(Pichard <i>et al.</i> 2006b)
Nickel	< 10 µg/L	< 1 µg/L	(Pichard <i>et al.</i> 2006c)

IND : Information non disponible

### 1.1.2. Réglementation et toxicité de ces composés

Afin de préserver notre environnement, l'Union Européenne a établi, en 2000, un cadre communautaire pour la protection et la gestion des eaux : la directive Cadre dans le domaine de l'eau (2000/60/CE). Cette directive vise à protéger l'environnement, en demandant de veiller à la non-dégradation de la qualité des eaux et d'atteindre d'ici 2015 un bon état écologique tant pour les eaux souterraines que pour les eaux superficielles, y compris les eaux côtières. En application de ce texte, une liste de 33 substances à détecter en priorité dans l'environnement comprenant des métaux (cadmium, plomb, mercure et nickel) a été adoptée en 2001 (décision n° 2455/2001/CE du 20 novembre 2001) et consolidée le 16 décembre 2010 (NOR : DEVO1017166A).

A cette liste vient s'ajouter l'ensemble des textes réglementaires relatifs à la qualité des eaux de boisson et de baignade fixant des valeurs de concentration limite (tableau 3).

**TABLEAU 3 :** LIMITE DE QUALITE DES EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE EN FRANCE

Composé	Seuil légal (eau de consommation)	Recommandation de l'OMS <sup>2</sup> (2004)	Référence législative
Cadmium	5µg/L	3µg/L	Décret n°2001-1220
Arsenic	10µg/L	10µg/L	Décret n°2001-1220
Mercure	1µg/L	1µg/L	Décret n°2001-1220
Cuivre	2mg/L	2mg/L	Décret n°2001-1220
Nickel	20µg/L	20µg/L	Décret n°2001-1220
Plomb	10µg/L	10µg/L	Décret n°2001-1220

L'objectif de l'instauration d'un tel cadre législatif est avant tout de protéger la santé publique des dangers que représentent ses composés. En effet, ces composés peuvent présenter des niveaux de toxicité variables selon leurs natures. Certains métaux contribuent au bon fonctionnement des chaînes métaboliques (co-facteur de réactions enzymatiques), c'est le cas du zinc, du fer, du cuivre ou encore du manganèse. D'autres, comme le cadmium, le mercure, le plomb ou l'arsenic n'ont pas d'intérêt biologique et présentent de hauts niveaux de toxicité à faibles doses (Graeme and Pollack 1998, Skerfving 1998). Certains de ces composés présentent également des propriétés cancérigènes et/ou mutagènes (cadmium, mercure, nickel, plomb...). Le risque est d'autant plus important que ces composés sont concentrés dans l'organisme par bioaccumulation<sup>3</sup>. Le tableau 4 reprend les caractéristiques toxicologiques de certains de ces composés chimiques.

### 1.1.3. Méthodes d'analyses

Les méthodes analytiques les plus répandues actuellement pour le dosage des métaux sont les méthodes physico-chimiques. Toutefois, des méthodes alternatives apparaissent dans le domaine de la détection des métaux, c'est le cas des méthodes biologiques.

#### 1.1.3.1. Méthodes physico-chimiques

La nature et le nombre de substances à détecter ont conduit à l'utilisation de diverses techniques analytiques physico-chimiques. Ces méthodes sont très largement répandues pour des raisons de fiabilité et de sensibilité. En effet, certaines d'entre elles sont capables de déceler la présence de métaux à l'état de traces dans l'environnement. La directive 80/778/CEE indique les méthodes analytiques de référence pour l'analyse de l'eau potable. Toutefois d'autres méthodes chimiques sont utilisées traditionnellement (Anderson *et al.* 1996, Jackson and Mahmood 2002) dans le domaine de l'analyse chimique pour des secteurs comme l'agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, l'analyse médicale ou encore l'environnement (Tableau 6).

<sup>2</sup> : Organisation Mondiale de la Santé

<sup>3</sup> : Processus d'accumulation de produits chimiques par les organismes, provenant directement de l'eau ou découlant de la consommation de nourriture contenant les produits chimiques

**TABLEAU 4 : DONNEE TOXICOLOGIQUE DES CERTAINS METAUX**

Composé	Toxicité aiguë	Dose létale <sup>1</sup> (Ingestion)	Toxicité chronique		Classification *	Références
			Effets systémiques	Effets cancérogènes		
<b>Cadmium</b>	Gastro-entérites, vomissements, diarrhées, myalgies	5g	Néphropathies, lésions des reins	Cancers pulmonaires en particulier	UE : 2 IARC : 1 US EPA : B1	(Wiśniewska-Knypl <i>et al.</i> 1972, Pichard <i>et al.</i> 2005a)
<b>Mercure inorganique</b>	Lésions gastro-intestinales, troubles rénaux	10-50 mg/kg	Troubles rénaux, neurologiques, cardiovasculaires	Pas d'information disponible	UE : NC IARC : 3 US EPA : C	(Pichard <i>et al.</i> 2006a)
<b>Arsenic</b>	Troubles gastro-intestinaux, neuropsychiques, encéphalopathies	1-3 mg/kg/j	Lésions cutanées, troubles vasculaires et cardiovasculaires	Cancers cutanés et des voies respiratoires	UE : 1 IARC : 1 US EPA : A	(La Rocca <i>et al.</i> 2010)
<b>Plomb</b>	Troubles digestifs, rénaux, hépatiques, atteintes du système nerveux central	2g/kg	Atteinte du système nerveux central et périphérique, troubles hématologiques, rénaux, cardiovasculaires	Cancers bronchiques et du rein	UE : 3 IARC : 2B US EPA : B2	(Pichard <i>et al.</i> 2003, Bonnard <i>et al.</i> 2006)
<b>Cuivre</b>	Fièvres, céphalées, vomissements, léthargies, anémies	IND	Troubles pulmonaires, gastro-intestinaux, hépatiques	Aucune relation établie	UE : NC IARC : NC US EPA : D	(Pichard <i>et al.</i> 2005b)

<sup>1</sup> : Dose létale observée pour l'homme

NC : Non classé

IND : Information Non Disponible

\* : Définition des codes de classification dans le tableau 5.

**TABLEAU 5 : CLASSIFICATION DES SUBSTANCES CANCEROGENES DES ORGANISMES DE CLASSIFICATION.**

Système de classification	Code	Définition
IARC (International Agency for Research on Cancer)	1	<i>Cancérogènes pour l'homme</i>
	2A	<i>Probablement cancérogène pour l'homme</i>
	2B	<i>Peut-être cancérogène pour l'homme</i>
	3	<i>Inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme</i>
	4	<i>Probablement pas cancérogène pour l'homme</i>
	NC	<i>Non classé</i>
UE (Union Européenne)	1	<i>Substance que l'on sait cancérogène pour l'homme.</i>
	2	<i>Substance devant être assimilée à une substance cancérogène pour l'homme.</i>
	3	<i>Substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation suffisante.</i>
	NC	<i>Non classé</i>
US EPA (United States Environmental Protection Agency)	A	<i>Cancérogène connu</i>
	B1	<i>Probablement cancérogène, basé sur des données humaines incomplètes</i>
	B2	<i>Probablement cancérogène, basé sur des données animales adéquates</i>
	C	<i>Cancérogène possible</i>
	D	<i>Non classé</i>

**TABLEAU 6 : METHODES TRADITIONNELLES DE DOSAGE DES METAUX ET LIMITES DE DETECTION**

Métal	Méthodes de détection	Limite de détection (µg/L)	Référence de la méthode
Cuivre	Spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme (F-AAS)	1	F / FD T 90-112
	Spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS)	1	ISO/CD 17291-1
Cadmium	Spectrométrie d'absorption atomique à flamme (F-AAS)	50	NF EN ISO 5961
	Spectrométrie d'absorption atomique à four graphite (GF- AAS)	0,3	NF EN ISO 5961
	Spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS)	0,1	ISO/CD 17291-1
Arsenic	Spectrométrie d'absorption atomique par la technique des hydrures	1	NF EN ISO 11969
		0,002	US EPA, Method 1632
Mercure	Spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS)	0 ,1	ISO/CD 17291-1
	Spectrométrie de masse à plasma inductif (ICP-MS)	0 ,05	ISO17294-2
	Spectrométrie d'absorption atomique avec vapeur froide	0,1	NF EN 1483
	Spectrométrie de fluorescence atomique	0,01	NF EN 13506

IND : Information Non Disponible

D'autres méthodes physico-chimiques sont désormais disponibles sur le marché. Elles sont moins précises mais permettent de répondre à un autre besoin : l'analyse *in situ*. Dans cette catégorie, on retrouve (tableau 7) :

- Les tests colorimétriques commercialisés notamment par les sociétés Merck® ou Hach Lange®. Ces méthodes se présentent généralement sous la forme de kit prêt à utiliser et semblent montrer de bonnes spécificités. En effet, d'après les instructions d'utilisation fournies par Merck®, de nombreux composés ont été testés ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , EDTA, NaCl,  $\text{NaCO}_3$ ,...) en présence ou absence de l'analyte (plomb, cuivre) sans montrer de perturbation d'analyse significative.
- Les sondes potentiométriques, électrodes sélectives d'ions, (Mimendia *et al.* 2009, Vassilev *et al.* 2009) commercialisées notamment par Thermo Scientific® ou Mettler Toledo®.
- Ainsi que d'autres technologies innovantes comme les sondes voltamétriques mises sur le marché par la société Sens-Innov ([www.sens-innov.com](http://www.sens-innov.com)).

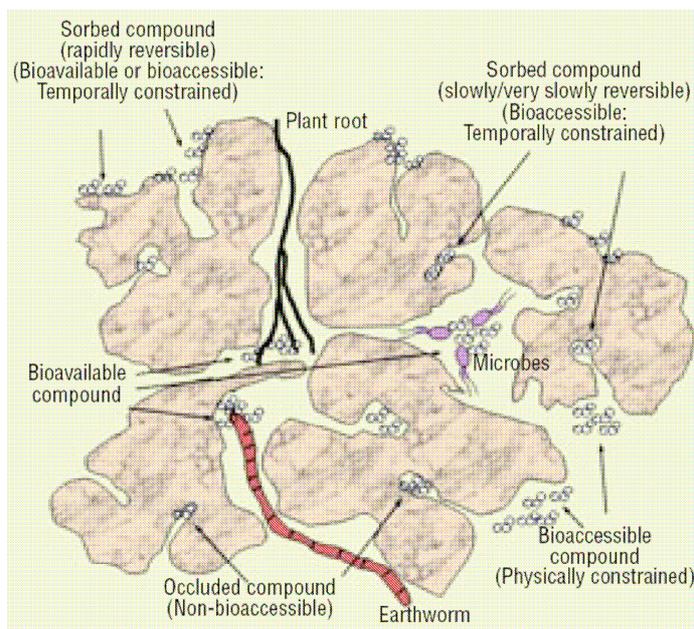
Enfin, d'autres méthodes physico-chimiques sont décrites dans la littérature scientifique, basées sur des capteurs à fibre optique (Ervin *et al.* 1993), des résonateurs micro-mécaniques (Rahafrooz and Pourkamali 2009) ou encore des sondes chimiques fluorescentes (Rurack *et al.* 1993) mais ne sont pas développées dans ce document.

**TABLEAU 7 : METHODES CHIMIQUES ALTERNATIVES DE DOSAGE DES METAUX ET LIMITES DE DETECTION**

Métal	Méthodes de détection	Limite de détection (µg/L)	Référence de la méthode
Cuivre	Colorimétrique	20	Merck®
		100	Hach Lange®
	Potentiométrique	6	Thermo Scientific®
		0,6	Mettler Toledo®
	Voltamétrique	320	Sens-Innov
Plomb	Colorimétrique	10	Merck®
		100	Hach Lange®
	Potentiométrique	200	Thermo Scientific®
			Mettler Toledo®
	Voltamétrique	20	Sens-Innov

### 1.1.3.2. Méthodes biologiques

Dans l'environnement, un composé se retrouve sous 3 formes : non bioaccessible, bioaccessible mais non biodisponible ou biodisponible. Selon l'IUPAC (: International Union of Pure and Applied Chemistry) (Nordberg *et al.* 2010), la bioaccessibilité est définie comme « le potentiel pour une substance d'entrer en contact avec un organisme vivant et d'interagir ensuite avec lui. », contrairement à la biodisponibilité qui représente la capacité réelle d'un composé à interagir avec un organisme vivant à un temps donné. Par conséquent, la fraction qui présente le plus de risque pour la santé et/ou l'environnement correspond à la fraction biodisponible. La figure 2 illustre les trois formes possibles d'un composé dans l'environnement.



**FIGURE 2 :** ILLUSTRATION DES NOTIONS DE BIODISPONIBILITE ET DE BIOACCESSIBILITE (SEMPLER ET AL. 2004)

L'incapacité des méthodes physico-chimiques à évaluer la fraction biodisponible dans un contexte de suivi en ligne, de polluants a poussé la communauté scientifique à s'intéresser à

une autre approche analytique par voie biologique. Ces méthodes alternatives s'appuient sur des éléments biologiques (bioéléments) de détection qui peuvent être de diverses natures : bactéries modifiées, anticorps, enzymes... (Verma and Singh 2005, Harms 2007, Magrisso *et al.* 2008). Le signal produit par le bioélément en réponse à la présence de l'analyte à détecter est mesuré par un capteur physico-chimique et converti en un signal électrique facilement analysable. La nature des bioéléments est directement liée à la nature du capteur physique : ampérométrique, potentiométrique, calorimétrique, colorimétrique ou optique (Verma and Singh 2005). Le tableau 8 reprend quelques exemples de méthodes biologiques développées en laboratoire.

**TABLEAU 8 :** QUELQUES EXEMPLES DE METHODES BIOLOGIQUES DE DOSAGE DES METAUX ET LIMITES DE DETECTION.

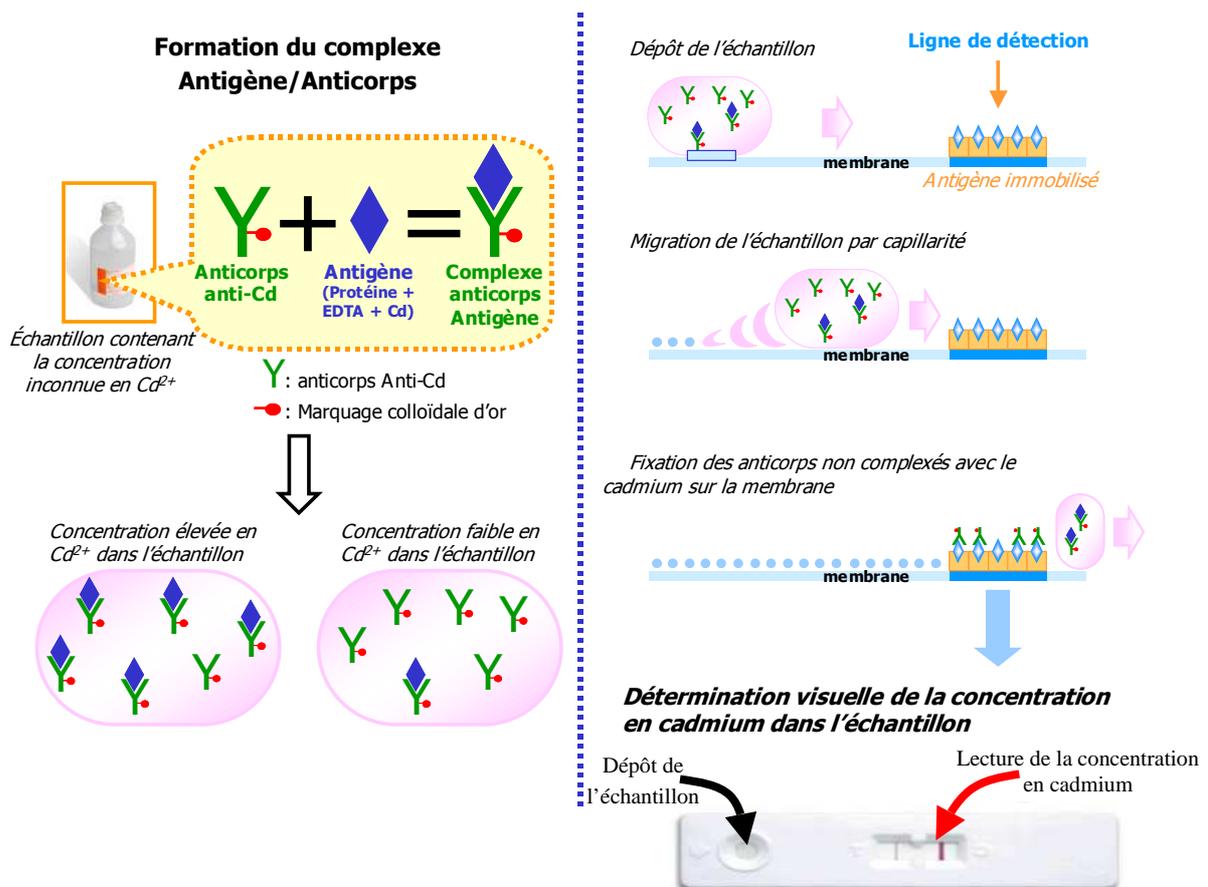
Élément biologique	Nature de l'élément	Capteur physique	Élément détecté	Limite de détection (µg/L)	Référence bibliographique
<b>Alcaline phosphatase</b>	Enzyme	Calorimètre	Zn	655	(Satoh 1991)
<b>Peroxidase</b>		Colorimètre	Hg	4	(Shekhovtsova <i>et al.</i> 1997)
<b>Anticorps monoclonaux anti-Cd (2A81G5)</b>	Anticorps	Test ELISA	Cd	6,75	(Khosraviani <i>et al.</i> 1998)
<b><i>Staphylococcus aureus</i> pTOO24</b>	Bactéries modifiées	Luminomètre	Cd	1,1	(Tauriainen <i>et al.</i> 1998)
			Pb	6,8	
<b><i>Escherichia coli</i> pUT-mer-lux</b>		Luminomètre	Hg	0,5	(Hansen and Sørensen 2000)
<b><i>Escherichia coli</i> pUT-mer-gfp</b>		Fluorimètre	Hg	2,5	
<b><i>Escherichia coli</i> pUT-mer-lac</b>		Colorimètre	Hg	0,5	
<b><i>Escherichia coli</i> DH1 pBARslux</b>		Luminomètre	As II	0,5	
			As V	5	

La paternité de la détection de métaux par bactéries peut être attribuée à Bitton *et al.* (1992) qui ont été parmi les premiers à développer un kit commercial spécifique des métaux : MetPAP™ (<http://www.metplate.com>). La principale fonction de cet outil analytique est d'évaluer spécifiquement la toxicité des métaux dans un échantillon, en aucun cas d'identifier ou de quantifier ces composés. Le principe de ce test repose sur la mesure de l'inhibition d'une enzyme insensible aux composés organiques mais sensible aux métaux.

D'autres outils ont vu le jour, dédiés à l'identification et à la quantification de métaux. Quelques exemples d'outils biologiques sont (ou ont été) sur le marché. C'est le cas du kit

bactérien Aboatox Biotox heavy Metal Assay Kits, commercialisé par la société finlandaise ABOATOX (<http://www.aboatox.com>) qui repose sur la détection de composé spécifique par bactéries bioluminescentes inductibles. Ces kits sont sensibles au mercure inorganique, à l'arsenic, au cadmium, au mercure organique ou au chrome. Un autre kit similaire Biomet<sup>®</sup>, commercialisé jusqu'en 2009 par la société belge Vito ([www.vito.be](http://www.vito.be)) permettait la détection du zinc, du cadmium, du cuivre, du plomb, du chrome 6, du nickel ou du mercure (Corbisier *et al.* 1994, Corbisier *et al.* 1999, Tibazarwa *et al.* 2001, Almendras *et al.* 2009). La principale limite de ces tests concerne la spécificité des capteurs bactériens. L'exemple du kit « Heavy metal assay kit-MERCURY » d'ABOATOX est assez représentatif. Outre le mercure, métal cible, le kit peut être induit par un autre métal (le cadmium) parmi les huit composés testés pouvant ainsi conduire à des faux positifs. L'interprétation des résultats obtenus reste donc limitée.

La société japonaise « Kansai Electric Power co inc. » (<http://www.kepco.co.jp/english>) a développé en 2004, un test immunologique pour la détection spécifique du cadmium (Abe *et al.* 2009, Sasaki *et al.* 2009). Ce dernier se présente sous la forme d'une bande de test immuno-chromatographique. (figure 3).



**FIGURE 3 :** PRINCIPE ET PHOTOGRAPHIE DU KIT IMMUNO-CHROMATOGRAPHIQUE POUR LA DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN CADMIUM

L'utilisation du kit de détection nécessite deux étapes : la première phase consiste à mettre en contact le cadmium (antigène), sous la forme d'un complexe (Protéine + EDTA + Cadmium), avec l'anti-corps spécifique marqué. Il y a formation d'un complexe anti-corps/antigène. Au

cours de la seconde étape, l'échantillon migre par capillarité sur une membrane poreuse sur laquelle sont immobilisés des antigènes.

Les anticorps non complexés avec le cadmium se fixent alors sur ces antigènes immobilisés. Une bande colorée (marquage des anti-corps) apparaît relative à la concentration en cadmium dans l'échantillon.

#### 1.1.3.3. Avantages et inconvénients des deux méthodes

L'intérêt majeur des méthodes physico-chimiques classiques repose sur la pertinence des informations fournies. En effet, ces méthodes permettent d'évaluer de manière très spécifique et avec une très grande précision, la concentration en métaux présents dans des échantillons inconnus. Toutefois, dans le cas d'échantillons complexes, ces méthodes de dosage peuvent impliquer des étapes préliminaires de traitement des échantillons (Benkhedda *et al.* 2002) ce qui engendre des coûts supplémentaires à ajouter au montant, déjà élevé (appareil de mesure cher, main d'œuvre qualifiée), des analyses : compter environ 35€<sup>HT</sup> pour le dosage d'un seul métal (devis obtenue en 2010 auprès du laboratoire départemental d'analyse de la Vendée). De plus, de part leur grande technicité, ces méthodes sont difficilement applicables dans le cadre de la surveillance en continu de l'environnement et s'adresse donc à des mesures ponctuelles.

Les méthodes physico-chimiques alternatives (kit colorimétriques, électrodes sélectives d'ion et sondes voltamétriques) semblent de bons compromis dans le cadre de la gestion de l'environnement. Ce sont des outils généralement moins précis que les méthodes chimiques classiques mais qui nécessitent des connaissances techniques beaucoup moins importantes pour leurs mises en oeuvre. Ces outils, conçus pour l'analyse de terrain, peuvent également permettre de suivre en continu les niveaux de pollutions d'un effluent (électrodes sélectives d'ion et sondes voltamétriques).

Cependant, la fiabilité de ces méthodes chimiques alternatives, tout comme les méthodes biologiques, reste à démontrer. En effet, la masse d'information disponible dans la littérature reste, à notre connaissance, limitée aux conditions expérimentales de laboratoire. Rares sont les études qui visent à évaluer la pertinence de telles méthodes dans l'environnement.

Dans tous les cas, les méthodes physico-chimiques utilisées dans le cadre de la surveillance en ligne de pollution visent à évaluer les concentrations totales en métaux dans les échantillons mais aucune ne permet de quantifier réellement la fraction biodisponible (fraction qui présente le plus de danger pour la santé public et l'environnement) d'où l'intérêt des méthodes biologiques.

De part la nature des capteurs, ces techniques évaluent uniquement la fraction biodisponible d'un composé dans un échantillon. Ce sont des outils complémentaires aux méthodes chimiques. On les retrouve soit sous la configuration d'outils de mesure ponctuels (ABOATOX, KEPCO) (Abe *et al.* 2009, Sasaki *et al.* 2009) soit sous forme d'outils de surveillance en continu des niveaux de métaux dans l'eau (Ivask *et al.* 2001, Ivask *et al.* 2002, Hakkila *et al.* 2004, Charrier 2006, Affi 2009, Ivask *et al.* 2009, Charrier *et al.* 2010a). Elles

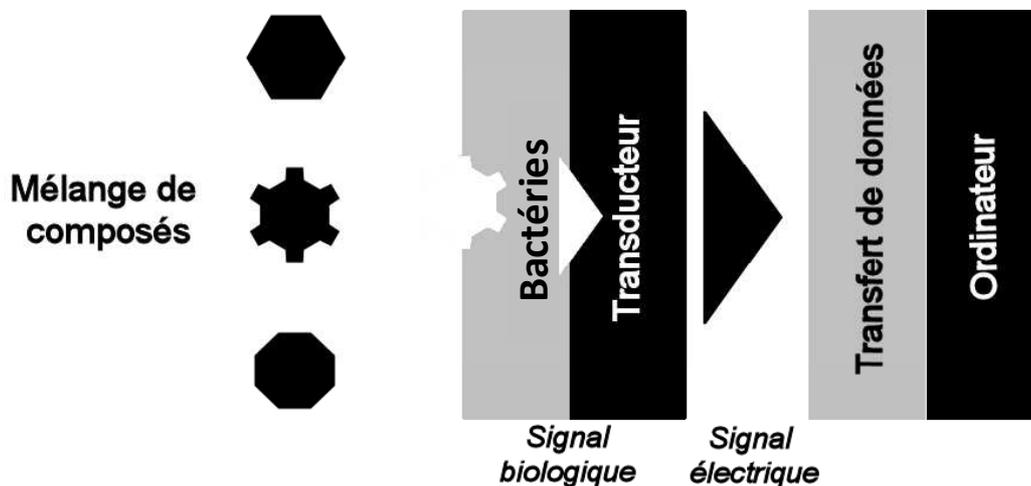
présentent des sensibilités comparables aux méthodes chimiques mais sont généralement beaucoup moins précises. L'inconvénient majeur de ces techniques réside dans la faible spécificité des capteurs biologiques qui engendrent des difficultés d'interprétation quant aux informations fournies (plusieurs métaux peuvent induire la même réponse bactérienne).

Tout l'enjeu de la thèse réside dans cette double problématique avec, d'une part, l'évaluation d'un outil de surveillance des pollutions aquatiques en continu, le biocapteur bactérien Lumisens III (Charrier 2006), en conditions environnementales et d'autre part, l'amélioration de l'interprétation des informations fournies par des systèmes biologiques d'analyses.

### 1.2. Biocapteur bactérien et bioéléments

Les biocapteurs sont des outils d'analyses par capteurs biologiques. La diversité des biocapteurs décrits dans la littérature est directement liée à la nature des éléments biologiques de reconnaissance. Dans le cadre de cette thèse, nous ne traiterons que le cas des biocapteurs bactériens.

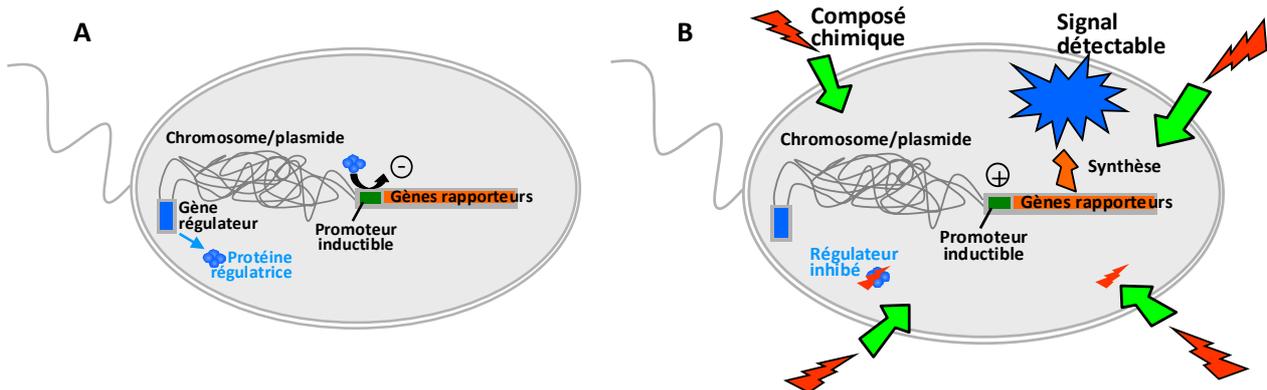
Un biocapteur est, selon l'IUPAC, un appareil intégré et autonome capable de fournir une information analytique quantitative ou semi quantitative en utilisant un élément de reconnaissance biologique retenu par un contact spatial direct à un élément de transduction (Thevenot *et al.* 2001) (figure 4). Cette définition précise qu'un biocapteur est un outil d'analyse capable, d'une part, de se régénérer après une mesure et, d'autre part de surveiller, en continu, la concentration d'un analyte.



**FIGURE 4 :** SCHEMA DE PRINCIPE D'UN BIOCAPTEUR BACTERIEN

Les capteurs bactériens disponibles peuvent être classés en deux catégories ayant chacune leur propre champ d'action : la première catégorie concerne principalement des cellules non génétiquement modifiées (Wong *et al.* 1997, Gu and Gil 2001, Pooley *et al.* 2004, Lin *et al.* 2006). Dans ce cas, la mesure repose sur la caractérisation de l'état physiologique des cellules exposées. La seconde catégorie concerne des capteurs bactériens dédiés à la détection spécifique de polluants ou de famille de polluants. Pour cela, les bioéléments utilisés sont des souches bactériennes génétiquement modifiées. Dans tous les cas, des gènes rapporteurs

(cf : 1.2.2. Systèmes rapporteurs) sont clonés en aval d'un promoteur permettant ainsi de mettre en évidence la présence spécifique ou semi-spécifique de certains composés dans un échantillon (D'Souza 2001, Lei *et al.* 2006). La figure 5 reprend le principe général de la détection par des bactéries modifiées : en absence d'inducteur (composé chimique spécifique), le régulateur inhibe la transcription et la traduction des gènes rapporteurs. En présence de l'inducteur, celui-ci se complexe avec la protéine régulatrice entraînant une levée de l'inhibition de la transcription/traduction des gènes rapporteurs. Il y a émission d'un signal détectable.



**FIGURE 5 :** MECANISME DE DETECTION SPECIFIQUE PAR DES BACTERIES MODIFIEES.

A : Répression des gènes rapporteurs par la protéine régulatrice en absence de composé chimique spécifique.

B : Levée de l'inhibition de la transcription des gènes rapporteurs liée à la pénétration intracellulaire du composé chimique spécifique se traduisant par l'apparition d'un signal détectable.

Dans le cas de la détection des métaux, les promoteurs utilisés sont majoritairement des promoteurs impliqués dans les mécanismes bactériens de résistance aux métaux lourds (Yoon *et al.* 1991, Yoon and Silver 1991, Liesegang *et al.* 1993, Ramanathan *et al.* 1997, Trajanovska *et al.* 1997, Nies 1999, Grass *et al.* 2000, Brown *et al.* 2002, Verma and Singh 2005, Charrier *et al.* 2010b).

### 1.2.1. Promoteurs inducibles

La plupart des essais environnementaux reposant sur la technologie des gènes rapporteurs, développés dans le cadre de l'amélioration de la surveillance de l'environnement, sont dédiés à la détection de métaux lourds (Revue par Köhler *et al.*, 2000). Cependant quelques exemples consacrés à des molécules organiques sont décrits dans la littérature (Willardson *et al.* 1998, Gueune *et al.* 2008). Dans ce cas, il s'agit généralement de promoteur impliqué dans le mécanisme de dégradation de ces composés afin de les utiliser en tant que source de carbone.

Comme nous l'avons précisé précédemment, les promoteurs, impliqués dans les mécanismes de résistance ou les voies de dégradation, ne sont pas spécifiques d'un unique composé mais généralement d'une gamme de plusieurs éléments. De plus, des différences de spécificité sont observées entre les différentes constructions génétiques, réalisées à partir du même promoteur, pouvant être liées aux systèmes rapporteurs mis en œuvre (Hakkila *et al.* 2002),

aux cellules hôtes et/ou aux conditions expérimentales de mesure (milieu de croissance, phase de croissance) (Charrier *et al.* 2010a).

L'application de capteurs bactériens pour la détection de composé implique donc une parfaite caractérisation de ces bioéléments bactériens inductibles avant toute étape de développement commercial.

**TABLEAU 9 :** QUELQUES EXEMPLES DE PROMOTEURS INDUCTIBLES AVEC LEURS CIBLES CHIMIQUES RESPECTIVES.

Promoteur	Cibles chimiques	Origines	Références bibliographiques
fliC	aluminium, cuivre, fer, nickel	<i>Escherichia coli</i>	(Guzzo <i>et al.</i> 1991)
ars	arsenic, antimoine	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	(Cai and DuBow 1996, Ramanathan <i>et al.</i> 1997, Tauriainen <i>et al.</i> 1997, Stocker <i>et al.</i> 2003)
cad	Cadmium, bismuth, plomb, étain, zinc	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	(Yoon <i>et al.</i> 1991, Corbisier <i>et al.</i> 1993, Tauriainen <i>et al.</i> 1998)
chr	chrome	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 pMOL28	(Peitzsch <i>et al.</i> 1998, Corbisier <i>et al.</i> 1999, Ivask <i>et al.</i> 2002)
mer	mercure, cadmium, méthylmercure, phénylmercure, diméthylmercure	<i>Escherichia coli</i> Tn21, <i>Serratia marcescens</i>	(Condee and Summers 1992, Selifonova <i>et al.</i> 1993, Holmes <i>et al.</i> 1994, Ivask <i>et al.</i> 2002)
smtA	zinc, cuivre, cadmium	<i>Synechococcus</i> PCC7942	(Huckle <i>et al.</i> 1993, Erbe <i>et al.</i> 1996)
alkB	alcane	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	(Sticher <i>et al.</i> 1997)
xyl	Dérivé benzène : m-xylène	<i>Pseudomonas putida</i> TOL	(Kobatake <i>et al.</i> 1995, Burlage 1998, Willardson <i>et al.</i> 1998)
ygaVP	Tributylétain, Dibutylétain	<i>Escherichia coli</i>	(Durand <i>et al.</i> 2003, Gueune <i>et al.</i> 2008, Gueune <i>et al.</i> 2009)

### 1.2.2. Systèmes rapporteurs

Les principaux systèmes rapporteurs qui sont utilisés pour la construction des bioéléments bactériens inductibles ont été présentés en détails par Köhler *et al.* (Köhler *et al.* 2000) et sont repris dans le tableau 10 avec le détail de leurs caractéristiques respectives (Hakkila *et al.* 2002, Harms 2007, Magrisso *et al.* 2008).

La  $\beta$ -galactosidase bactérienne est une enzyme capable de catalyser l'hydrolyse de  $\beta$ -galactoside. Cette enzyme est codée par le gène lacZ de *E.coli* et peut être utilisée comme rapporteur chez les eucaryotes et les procaryotes. L'activité enzymatique est mesurée par ajout d'un substrat, choisi en fonction de la méthode de mesure. Par exemple, l'hydrolyse du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) génère l'apparition d'un composé bleu, ce qui permet rendre compte de l'activité de l'enzyme.

La GFP, Green Fluorescent Protein, protéine isolée à partir d'une méduse *Aequorea victoria*, est une protéine ayant la propriété d'émettre de la fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 485nm, longueur d'onde d'émission : 535nm). Cette protéine, particulièrement stable peut être utilisée comme rapporteur dans des cellules eucaryotes comme procaryotes sans ajout de substrat ni de co-facteur (Kain and Kitts 1997). De nombreux variants sont

désormais disponibles avec des longueurs d'onde différentes (eGFP, eYFP, dsred, mRFP, dTomato,...)

**TABLEAU 10 :** GENES ET SYSTEMES RAPPORTEURS UTILISES POUR LA CONSTRUCTION DE BIOELEMENTS BACTERIENS INDUCTIBLES.

Système rapporteur	Gènes rapporteur	Origine	Méthode de détection	Caractéristiques Avantages/Inconvénients
<b>β-Galactosidase</b>	lacZ	<i>Escherichia coli</i>	Colorimétrique, électrochimique, fluorimétrique, luminométrique	Choix du substrat en fonction de la méthode de détection ; ajout de substrat requis
<b>Protéines fluorescentes</b>	Gfp et variants	<i>Aequorea victoria</i> <i>Discosoma sp.</i>	Fluorimétrique	Pas de substrat requis ; détection haute résolution ; Interférence d'auto-fluorescence des matrices naturelles ; oxygène requis
<b>Luciférase de luciole</b>	luc	Lucioles	Luminométrique	Haut rendement quantique ; détection sensible ; pas de sources naturelles d'émission de bioluminescence ; luciférine, oxygène et ATP indispensable à la réaction
<b>Luciférase bactérienne</b>	luxAB luxCDABE	Souches bactériennes naturellement bioluminescentes	Luminométrique	Bio-rapporteur robuste ; détection sensible ; Pas de sources naturelles d'émission de bioluminescence ; ajout d'aldéhyde requis ( <i>luxAB</i> ) ; oxygène indispensable à la réaction

La luciférase de luciole est codée par le gène *luc*. La réaction de bioluminescence, dépendante de l'oxygène, repose sur l'activation énergétique du substrat, la D-luciférine, par de l'ATP catalysé par la luciférase. Cette réaction engendre la formation d'oxyluciférine excitée, de dioxyde de carbone et d'AMP. Le retour de l'oxyluciférine à un état stable génère l'émission de photon à 560nm. L'utilisation de ce rapporteur nécessite cependant un apport extérieur de luciférine.

Enfin, la bioluminescence bactérienne, codée par l'opéron *lux*, est issue d'une réaction enzymatique catalysée par la luciférase bactérienne. Cette réaction, détaillée au paragraphe suivant (cf. paragraphe 1.3.), permet la formation d'un groupement luciférase-4 $\alpha$ -hydroxyflavine excité. Le retour à l'état stable de ce groupement entraîne l'émission d'un photon à une longueur d'onde maximale de 490nm (Dmitriev 2000, Thouand *et al.* 2003a).

Le choix du système rapporteur dépend du type d'outil développé (bioessai ou biocapteur) et de la nature du transducteur utilisé. En effet, les avantages et les inconvénients qu'implique chaque rapporteur sont des paramètres importants à évaluer afin de satisfaire au mieux les exigences de l'application souhaitée. Dans le cadre du développement d'un biocapteur en ligne et en continu pour la surveillance des niveaux de pollution d'un effluent, l'ajout de substrat est à éviter (complexification technologique, interaction avec les échantillons). Dans ce cadre, il est recommandé d'utiliser comme système rapporteur soit la GFP (fluorescence) (Biran and Walt 2002) soit la bioluminescence bactérienne (opéron complet *luxCDABE*) (Thouand *et al.* 2003b, Lee and Gu 2005).

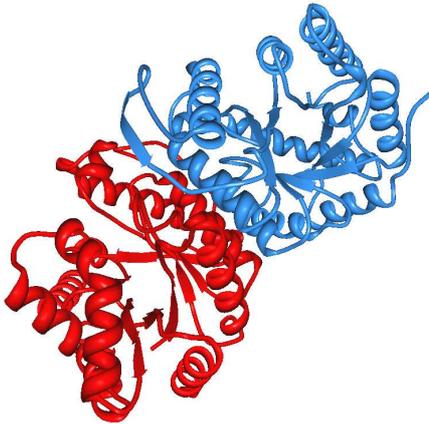
### 1.2.3. Bioluminescence bactérienne

Dans la plupart des cas, les biocapteurs bactériens reposent sur des bioéléments bactériens bioluminescents. La simplicité de la mise en œuvre (contrairement à la méthode des GFP qui implique une étape d'excitation avant la mesure) et l'autonomie de l'opéron de la bioluminescence bactérienne (pas de substrat extérieur à apporter contrairement au gène *luc*) sont des facteurs pouvant expliquer ce choix.

### 1.2.4. Réaction biochimique de la bioluminescence bactérienne

Les opérons de la bioluminescence sont issus de souches bactériennes naturellement bioluminescentes (Ulitzur 1989, Meighen 1991, Meighen 1993, Medvedeva et al. 2005, Medvedeva et al. 2008). Cinq souches bactériennes ont été plus particulièrement étudiées : *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum* et *Photobacterium luminescens*.

La réaction de bioluminescence est catalysée par une enzyme, la luciférase (figure 6), constituée de deux sous-unités :  $\alpha$  (40kDa) et  $\beta$  (36 kDa) (Meighen 1993). La sous-unité  $\alpha$  est le site catalytique de l'enzyme, son centre actif est localisé sur cette sous-unité ainsi que le site de fixation du substrat (FMNH<sub>2</sub>). Le rôle spécifique de la sous-unité  $\beta$  est inconnu mais est cependant essentiel au niveau de la bioluminescence (Meighen 1991). Les luciférases bactériennes peuvent être classées en deux catégories en fonction de leurs stabilités (Nealson and Hastings 1979) ; faible stabilité enzymatique : cinétique rapide de diminution de la bioluminescence (*Vibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi*, *Photobacterium phosphoreum*) ou bonne stabilité enzymatique : cinétique lente de diminution de la bioluminescence (*Vibrio harveyi* et *Photobacterium luminescens*).



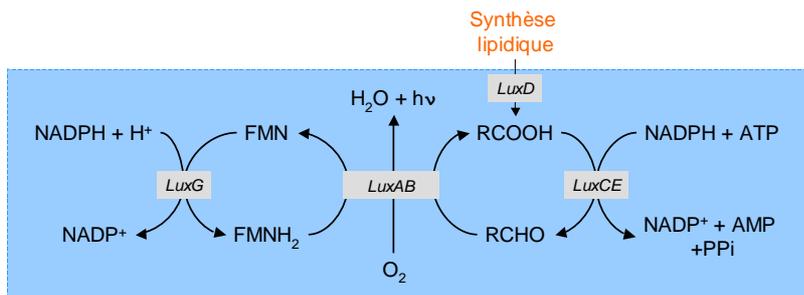
**FIGURE 6 :** REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE EN TROIS DIMENSIONS DE LA LUCIFÉrase BACTERIENNE DE *VIBRIO HARVEYI*. (FISHER ET AL. 1996)

En bleu : Sous-unité  $\alpha$  (40kDa)  
En rouge : Sous-unité  $\beta$  (36 kDa)

La luciférase catalyse une double réaction d'oxydation d'un aldéhyde à longue chaîne (co-facteur de la réaction) et d'une flavine mononucléotide réduite (FMNH<sub>2</sub>), substrat de l'enzyme, respectivement en acide gras et en FMN. Lors de cette réaction, il y a formation d'un complexe oxydé instable, luciférase/aldéhyde, qui va émettre un photon lors de son retour à un état stable (Inouye 1994). La lumière ainsi produite est émise à 490nm et 590nm (Thouand et al. 2003a).

### 1.2.5. Génétique de la bioluminescence

Les gènes responsables de la bioluminescence bactérienne codent pour des enzymes nécessaires à la réaction. Ils sont regroupés dans un opéron quasiment similaire d'une souche bioluminescente à une autre. Les principaux gènes sont les gènes *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* et *luxE*. *luxD* code pour une synthétase responsable de la synthèse de l'aldéhyde (co-facteur de la réaction de bioluminescence). Les gènes *luxC* et *luxE* codent respectivement pour réductase et une transférase qui permettent une réduction de l'acide carboxylique (sous-produit de la réaction) en aldéhyde. Enfin, les gènes *luxA* et *luxB* codent pour les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase (figure 7).



**FIGURE 7 :** RELATION ENTRE REACTION DE BIOLUMINESCENCE BACTERIENNE, GENES ET ENZYMES LIES A L'OPERON LUX.

RCOOH, acide carboxylique ; RCHO, aldéhyde ; *luxC*, *luxD* et *luxE* représente respectivement une réductase, une transférase et une synthétase. *luxAB* code pour les 2 sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la luciférase. *luxG* code pour une FMN réductase.

### 1.2.6. Paramètres influençant la bioluminescence bactérienne

Le premier point qui agit sur la réaction de bioluminescence concerne la luciférase. Cette enzyme possède une stabilité et une activité directement liées à la température et à l'origine biologique de l'opéron de la bioluminescence. En effet, les luciférases des souches *Vibrio harveyi* et *Photobacterium luminescens* présentent une meilleure stabilité à 37°C que la luciférase de *Vibrio fischeri* à cette même température (Szittner and Meighen 1990, Meighen 1991). A 45°C, la demi-vie de la luciférase de *Photobacterium luminescens* est de l'ordre de 3 heures alors que celle de *Vibrio harveyi* ne dépasse pas 5 minutes. L'activité de l'enzyme est également dépendante de la température : T.Charrier (2006) montre dans ses travaux que l'activité de la luciférase de *Vibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi*, et *Photobacterium luminescens* est plus importante à 30°C qu'à 37°C contrairement à *Vibrio harveyi*. Enfin, Mackey *et al.* (1994) a mis en avant que la thermo-stabilité de la luciférase peut également varier en fonction de la souche hôte dans laquelle a été cloné l'opéron de la bioluminescence.

De plus, la réaction de bioluminescence bactérienne implique nécessairement la présence d'un substrat (FMNH<sub>2</sub>) d'un co-facteur (aldéhyde à longue chaîne) et d'oxygène. Pour la synthèse enzymatique de l'aldéhyde, la réaction a besoin de NADPH, d'ATP et d'un acide carboxylique à longue chaîne. L'ensemble de ces composés proviennent directement de la machinerie cellulaire de la bactérie. Il en est de même pour la synthèse du FMNH<sub>2</sub> qui nécessite du NADPH, des protons (H<sup>+</sup>) et du FMN. Par conséquent, la production de bioluminescence, étant directement liée à l'état physiologique de la bactérie, peut varier en fonction de l'environnement (stress environnemental, inhibiteur de la synthèse du FMN,...). D'autre part, l'oxygène, facteur essentiel de la bioluminescence, doit être présent en quantité

suffisante dans l'environnement cellulaire afin de ne pas limiter la réaction. Plusieurs études ont pu mettre en évidence que la phase de croissance, la densité cellulaire, l'oxygène dissous, la température, le pH ou encore le milieu de culture (Korpela *et al.* 1989, Neilson *et al.* 1999, Dorn *et al.* 2003, Durand *et al.* 2003, Koga *et al.* 2005, Galluzzi and Karp 2007) sont des facteurs prépondérants et par conséquent à maîtriser, dans la réaction de bioluminescence bactérienne.

Pour conclure, l'utilisation de la bioluminescence bactérienne comme système rapporteur biologique en biocapteur présente de nombreux avantages (facilité d'utilisation, précision et sensibilité de mesure). Cependant, il est important de prendre certaines précautions quant à l'utilisation de ce système rapporteur :

- Concentration suffisante et stable en oxygène dissous
- Température et pH stables
- Stabilité de l'état physiologique des bactéries.

### **1.2.7. Exemples de biocapteurs bactériens bioluminescents**

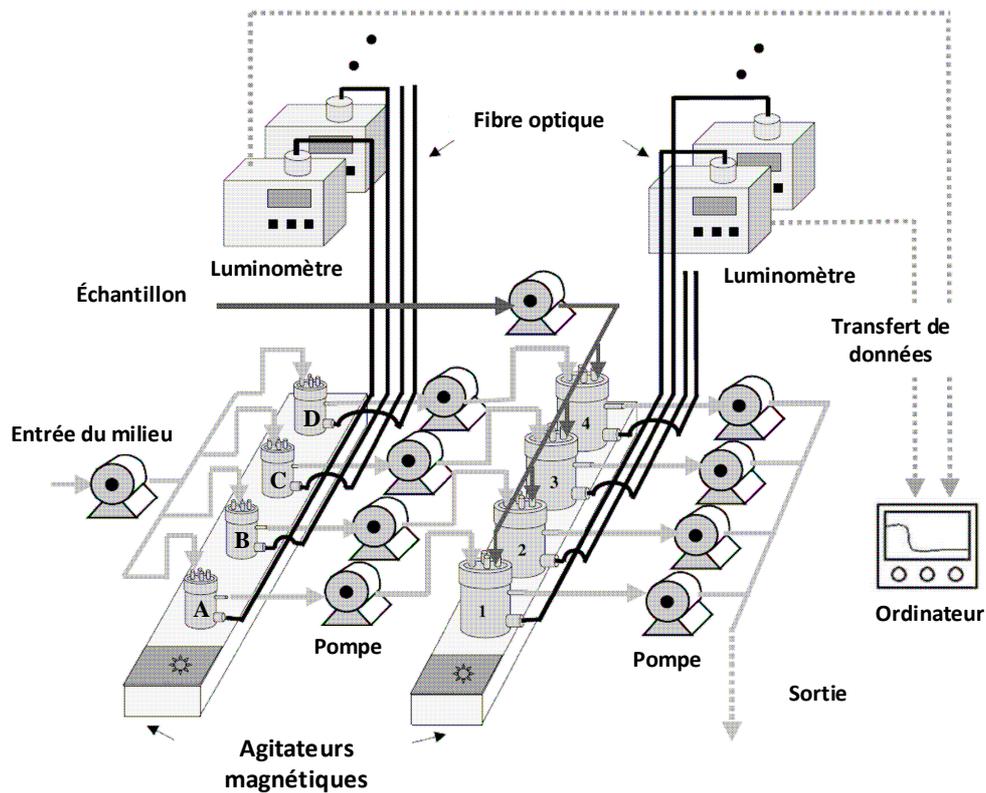
Les biocapteurs bactériens développés au cours des dix dernières années concernent principalement trois secteurs d'activités : l'environnement, l'agroalimentaire et le médical. Leur simplicité d'utilisation, le faible coût et leur rapidité de réponse sont des arguments intéressants qui rendent ces méthodes biologiques séduisantes pour le suivi simultané de la fraction biodisponible de polluants ainsi que de leur niveau de toxicité (Belkin 2003).

On peut répertorier deux familles de biocapteurs bactériens selon la configuration des bactéries dans la cellule de mesure soit en phase liquide, soit en phase immobilisée.

#### *1.2.7.1. Biocapteurs bactériens en phase liquide*

Le seul système commerciale répertorié, TOXControl, distribué par microLAN (<http://www.toxcontrol.com>), est un outil de suivi en ligne de la qualité des eaux (eaux potables ou eaux usées). Il permet d'évaluer en temps réels la toxicité d'une eau à partir de la mesure de bioluminescence (taux d'inhibition) émise par les bactéries (*Vibrio fischeri*) selon la norme ISO 11348-1.

Outre ce système, on peut également citer les systèmes expérimentaux développés par Gu et Gil (2001), Horry *et al.* (2004) ou encore Lee et Gu (2005). Ces systèmes se présentent sous la forme de bioréacteurs permettant la culture et le maintien des bactéries dans un état stable (phase exponentielle de croissance). Toutefois, le mode de contact entre l'échantillon et les bactéries diffère selon les auteurs. Pour Gu et Lee, le contact entre les bactéries et l'échantillon est effectué dans un réacteur secondaire. Cette disposition évite toutes perturbations éventuelles des cultures bactériennes lors de l'ajout du polluant dans le bioréacteur en continu (Figure 8). Dans le cas du système développé par Horry (2004), le contact est réalisé directement au sein du bioréacteur de culture permettant ainsi une simplification considérable du système.



**FIGURE 8 :** REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BIOCAPTEUR MULTICANAL EN PHASE LIQUIDE DEVELOPPE PAR GU ET GIL (2001).

Les mini-réacteurs A, B, C et D sont dédiés à la culture des souches, respectivement, *E.coli recA::luxCDABE* (inductible), *fabA::luxCDABE* (inductible), *grpE::luxCDABE* (inductible) et *lac::luxCDABE* (constitutive). Les réacteurs 1, 2, 3 et 4 sont des réacteurs d'analyse alimentés, d'une part, avec des bactéries fraîches (réacteurs de culture) et d'autre part avec l'échantillon à analyser. La bioluminescence bactérienne est mesurée en continu dans l'ensemble des bio-réacteurs afin de suivre l'induction ou l'inhibition de la bioluminescence. Ce système a été testé en condition de laboratoire sur des échantillons artificiels d'eau distillée contenant un mélange de mitomycine C (50µg/L), de céruléine (5mg/L) et de phénol (100mg/L).

En conditions de laboratoire, l'utilisation de bioréacteurs permet un contrôle de l'ensemble des paramètres susceptibles d'influencer la bioluminescence (oxygène, température, pH, état physiologique). De plus, la matrice liquide permet une diffusion très rapide dans le bioréacteur de l'ensemble des composés (oxygène, nutriment, polluant). Les principales limites observées concernent l'apparition de biofilm dans le bioréacteur perturbant la mesure de la bioluminescence et le mode de maintien des bactéries qui ne permet pas d'avoir différentes souches bactériennes limitant ainsi le nombre d'analyse réalisable, à l'exception du système complexe développé par Gu et Gil (2001).

Cependant, il est important de préciser que les données visant à définir les performances de ces biocapteurs (durée maximale d'analyse, reproductibilité,...) restent très limitées tout comme les données concernant l'analyse d'échantillons environnementaux (Charrier 2006).

D'autre part, ces systèmes présentent une contrainte technologique commune liée au mode d'exposition échantillon/bactéries. En effet, l'analyse nécessite la mise en contact entre l'échantillon analysé et les bactéries par injection dans le réacteur biologique ce qui implique une dilution de l'échantillon et indéniablement une perte de sensibilité (Gu and Gil 2001, Horry *et al.* 2004). Enfin, le maintien de tels systèmes biologiques requiert des connaissances importantes en microbiologie ce qui exclut une utilisation par des non initiés.

#### 1.2.7.2. Biocapteurs bactériens en phase immobilisée

- Principes d'immobilisation

Dans la seconde famille de biocapteur, les bioéléments sont immobilisés sur un support solide (Pernetti *et al.* 2009, Eltzov and Marks 2010). La technique d'immobilisation des bactéries doit suivre un cahier des charges précis afin de ne pas interférer de quelques manières que ce soit, sur le signal biologique : altération des cellules, inhibition physique du signal (utilisation d'une matrice opaque qui inhibe la bioluminescence des bactéries). Plusieurs méthodes ont été développées pour immobiliser les bactéries en se basant sur deux principes : l'immobilisation physique ou chimique.

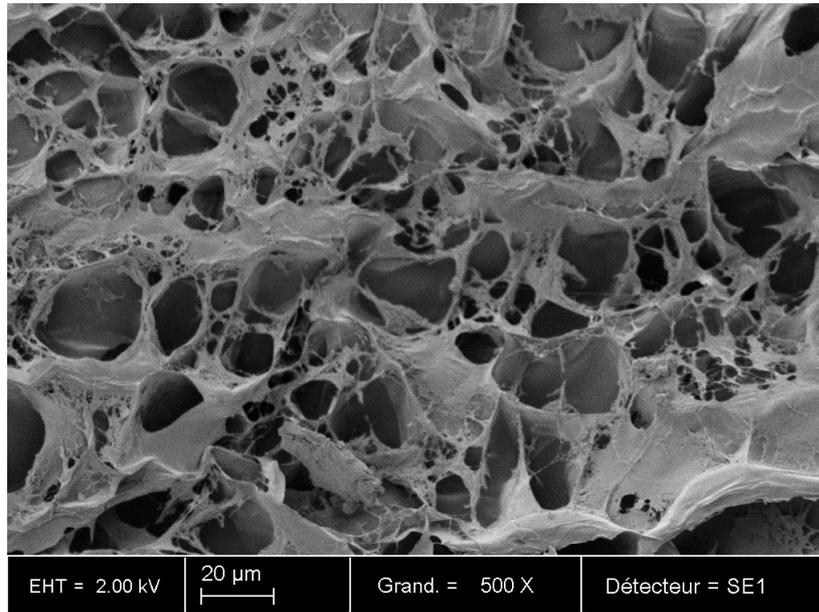
La première technique physique, dite «d'adsorption» consiste à piéger les bactéries vivantes dans un support poreux (Ball 1999) tel que des disques de diméthyl silicone (Roach *et al.* 2003). Dans ce cas, le support est introduit dans le milieu de culture des bactéries et ces dernières vont coloniser tout naturellement le support.

La seconde technique physique vise à piéger les cellules dans une matrice solide de type hydrogel de polymère. Pour cela, un mélange bactérie/polymère est réalisé avant d'être polymérisé chimiquement ou physiquement selon la nature du polymère (k-carrageenan, agar, agarose, alginate, polyuréthane-polycarbonyl sulfonate (PCS), polyacrylamide, polyvinyle alcool (PVA), sol-gel) (Heitzer *et al.* 1994, Leenen *et al.* 1996, Simpson *et al.* 1998, Leth *et al.* 2002, Ivask *et al.* 2007). Les bactéries sont ainsi retenues au sein du réseau de polymères (Affi 2009) (Figure 9).

Enfin l'immobilisation chimique, très largement utilisée dans les biocapteurs électrochimiques, consiste à lier des cellules à la surface d'un support solide par adhésion (Mulchandani and Rogers 1998, Pernetti *et al.* 2009). Les liaisons entre cellules et le support peuvent être de 2 types :

- les liaisons directes peuvent se former entre les cellules et le support (cellulose, verre, tissus de coton, membrane synthétique) de part ces propriétés de surface. Dans ce cas, les liaisons établies sont faibles et ne permettent pas de maintenir les cellules sur le support.
- les liaisons indirectes qui repose sur un élément intermédiaire permettant une meilleure fixation des cellules au support. Ces éléments intermédiaires de liaison peuvent être de différentes natures (protéines, polymères, anti-corps, etc. ). La forte stabilité de ces

liaisons bioéléments/supports exclut la réutilisation des supports d'immobilisation ainsi que la régénération des matrices.



**FIGURE 9 :** STRUCTURE EN RESEAU D'UN HYDROGEL D'AGAROSE A 2% (AFFI 2009).

Image de surface sans bactérie obtenu par microscopie électronique à balayage, agrandissement X 500.

Idéalement, le support d'immobilisation doit être un matériau non soluble (sous sa forme polymérisé) et non biodégradable. Il doit posséder de bonnes propriétés mécanique et rhéologique, qui lui permettent de résister à l'abrasion, ainsi que des coefficients de diffusion élevé. Il doit également permettre la croissance des bactéries. Enfin son utilisation doit être la plus simple possible (Leenen *et al.* 1996). Le choix de l'immobilisant doit prendre en compte l'ensemble de ces critères afin de déterminer le matériau qui présente le plus d'avantage vis à vis de l'utilisation souhaitée.

La technique d'immobilisation généralement choisie pour immobiliser les cellules bactériennes utilise un hydrogel (méthode physique d'emprisonnement des bactéries). Cette méthode, facile à mettre en œuvre et biocompatible, permet un contact spatial direct entre les bioéléments et le transducteur. Dans notre cas, plusieurs études (Pernetti 2004, Charrier 2006) ont montré que les polymères d'agarose étaient le meilleur compromis dans le cadre de l'immobilisation de bactéries bioluminescentes pour la détection de métaux dans l'environnement. En effet, outre la facilité d'utilisation, cette matrice d'hydrogel présente des propriétés physiques (*résistance mécanique, adsorption, diffusion*), chimiques (*stabilité*), optiques (*transparence*) et biologiques (*faiblement biodégradable, compatibilité avec l'émission de la bioluminescence*) adéquates pour l'utilisation en biocapteur.

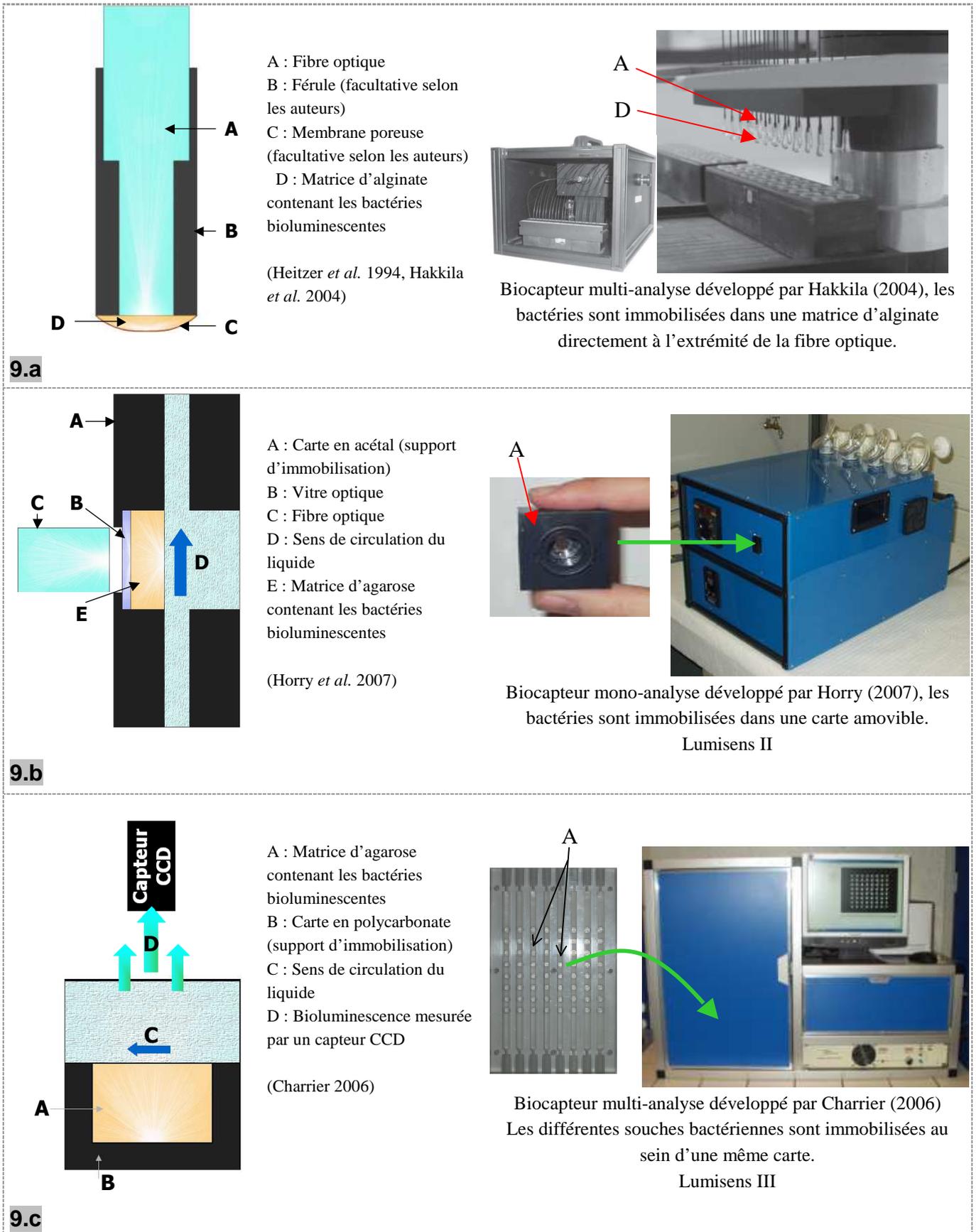
- Exemple de biocapteurs bactériens optiques en phase immobilisée

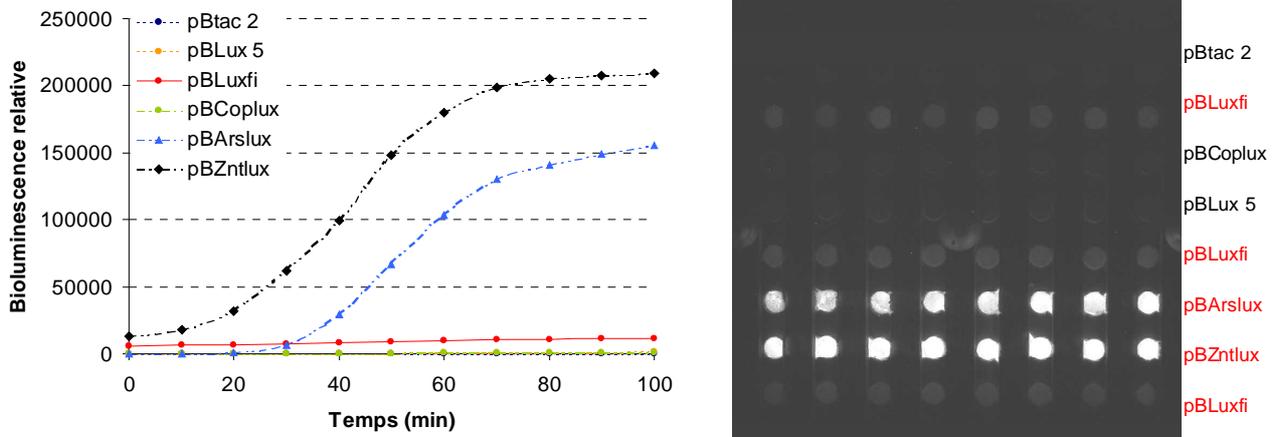
Quelques exemples de biocapteurs bactériens utilisant des bioéléments immobilisés sont décrits dans la figure 10.

Sur le premier schéma (Figure 10.a), les bactéries sont immobilisées directement sur la fibre optique. Les protocoles diffèrent d'un auteur à un autre : Heitzer *et al.* (1994) utilise une membrane poreuse afin de retenir les bactéries dans l'hydrogel d'alginate alors que Hakkila *et al.* (2004) polymérise directement les hydrogels contenant les bactéries sur la surface de la fibre optique. Le signal de bioluminescence produit par les bactéries est transporté dans la fibre optique pour être mesuré à l'aide d'un photomultiplicateur. Ce système peut permettre une analyse multicritère en immobilisant un capteur biologique différent sur chacune des fibres optiques utilisées.

Dans le cas du second biocapteur (Figure 10.b) : Lumisens II, le système physique de mesure est identique au précédant (fibre optique + photomultiplicateur). Cependant, les bactéries sont immobilisées dans un gel en polymère d'agarose au sein d'une carte amovible en acétal. Ce système permet un suivi d'un seul paramètre d'un effluent.

Enfin, la figure 10.c montre une troisième approche pour le suivi simultané de plusieurs polluants. Dans ce cas, les bactéries sont immobilisées dans une matrice d'agarose au sein d'une carte multi-puits en polycarbonate. Chaque puits est susceptible de retenir une souche bactérienne différente ce qui peut permettre d'effectuer une analyse multicritère en simultané. Ici, le signal de bioluminescence est mesuré par une caméra CCD qui surplombe les bactéries immobilisées. Un exemple de détection de métaux réalisé par ce biocapteur est repris dans la figure 11.





**FIGURE 11 :** DETECTION D'UN MELANGE DE CADMIUM (500nM) ET D'ARSENIC (5 $\mu$ M) DANS LE BIOCAPTEUR LUMISENS III

pBtac2 : Souche témoin d'*E. coli* avec un plasmide sans opéron de bioluminescence ; pBLux5 : Souche témoin d'*E. coli* transformée avec un plasmide contenant l'opéron de bioluminescence sans promoteur ; pBLuxfi : Souche témoin d'*E. coli* transformée avec un plasmide contenant l'opéron de bioluminescence sous le contrôle d'un promoteur constitutif (ptac) : Témoin de toxicité ; pBCoplux, pBArslux et pBZntlux : Souche d'*E. coli* transformée avec un plasmide contenant l'opéron de bioluminescence sous le contrôle d'un promoteur inductible (respectivement p*copA*, p*arsR* et p*zntA*).

- Avantages/inconvénients des biocapteurs bactériens en phase immobilisés

Contrairement aux biocapteurs en phase liquide, les biocapteurs en phase immobilisée sont dans la plupart des cas des outils d'analyses multi-critères. En effet, le mode de maintien des bactéries permet de multiplier le nombre de souches bactériennes et donc le nombre d'analyses réalisables (Hakkila *et al.* 2004, Charrier 2006). De plus, l'immobilisation des bactéries permet un contact direct entre échantillon et bactéries sans aucune dilution. Toutefois, à l'inverse des systèmes en phase liquide, les biocapteurs en phase immobilisée disposent de peu d'outils de contrôle des paramètres susceptibles d'influencer la bioluminescence mis à part la température (Charrier 2006, Horry *et al.* 2007). Cette absence limite nettement la gestion des bactéries et l'interprétation des données de bioluminescence obtenues. En outre, les travaux de T.Charrier (2006, 2010b) montrent que l'immobilisation des bactéries tend à augmenter le temps de réponse des bactéries. Ce constat pourrait s'expliquer par la réduction des vitesses de diffusion des composés (beaucoup plus lente qu'en phase liquide) à travers la matrice solide (Affi 2009, Affi *et al.* 2009).

Malgré une configuration qui apparaît comme plus en adéquation avec une utilisation dans l'environnement (pas de dilution de l'échantillon, simplification d'utilisation, connaissances techniques moins importantes), le nombre de publication reste limitée (Hakkila *et al.* 2004, Charrier *et al.* 2010b). De plus, la majorité des études publiées sur la thématique de la détection de polluant par biocapteur bactérien ne dépassent généralement pas le stade de

l'étude de faisabilité et rares sont celles qui visent à caractériser précisément les performances de ces systèmes (stabilité dans le temps, influence de l'environnement, reproductibilité).

### **1.2.8. Conclusions sur les biocapteurs bactériens**

Dans tous les cas, le manque notable de données de caractérisation et d'évaluation des performances des biocapteurs freine considérablement la reconnaissance scientifique de ces nouveaux outils biologiques de détection ainsi que leur développement industriel. En effet, les études réalisées dans ce domaine, biocapteurs en phase liquide ou biocapteur en phase immobilisée, restent dans la plupart des cas, à l'étape de développement technique et technologique et les systèmes développés ne sont généralement pas évalués en conditions réelles (suivi environnemental, gestion industrielle). Aussi, il est nécessaire, dans le cadre du développement d'un tel système, de mieux caractériser ces outils (viabilité dans la durée, reproductibilité...) et d'évaluer la pertinence de ces biocapteurs pour la détection de polluant dans des environnements complexes et aléatoires (environnement, industrie agroalimentaire, industrie chimique, métallurgie,...) afin d'avoir une meilleure vision de l'impact des facteurs environnementaux sur les capteurs biologiques (bactéries bioluminescentes).

Outre l'aspect de la caractérisation des biocapteurs, une autre contrainte apparaît avec l'utilisation de capteurs bactériens bioluminescents pour la détection de polluant. En effet, la faible spécificité de ces capteurs limite fortement l'interprétation des données biologiques.

### **1.3. Interprétation des données biologiques de bioluminescence**

Comme précisé précédemment (1.1.3.2. Méthodes biologiques), l'amélioration de l'interprétation des données de bioluminescence fournie par des bioéléments bactériens modifiées (inductibles ou constitutifs) est un élément indispensable à la poursuite du développement des biocapteurs bactériens. Cependant la quasi-totalité des publications qui traitent de la détection d'analytes par bioéléments bactériens, visent à développer de nouveaux capteurs sans jamais proposer d'outils pour l'interprétation des résultats (Hakkila *et al.* 2004). A titre d'exemple, Ivask *et al.*, en 2009, a publié une étude ayant pour objectif d'évaluer la biodisponibilité des métaux lourds dans des échantillons d'eau et de sol en utilisant 11 souches bactériennes bioluminescentes. La figure 12 représente la spécificité des différentes souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Chaque souche est susceptible d'être induite par différents métaux à l'exemple de *Escherichia coli* MC1061(pmerR<sub>BS</sub>Pmerlux) (Figure 12A) qui répond au chlorure de méthylmercure, chlorure de mercure et au chlorure de cadmium ou encore la souche *Pseudomonas fluorescens* OS8::KncadR<sub>P</sub>cadAlux (Figure 12H) induite par du chlorure de mercure, chlorure de cadmium, du nitrate de plomb et du sulfate de zinc.

La difficulté apparaît lorsque l'on prend le problème dans le sens inverse : on cherche à identifier, voir à quantifier, les métaux présents dans les échantillons inconnus à partir des capteurs biologiques. Dans ce cas, la seule information disponible est l'intensité du signal de bioluminescence émis par les bactéries en présence de l'échantillon testé (Figure 13).

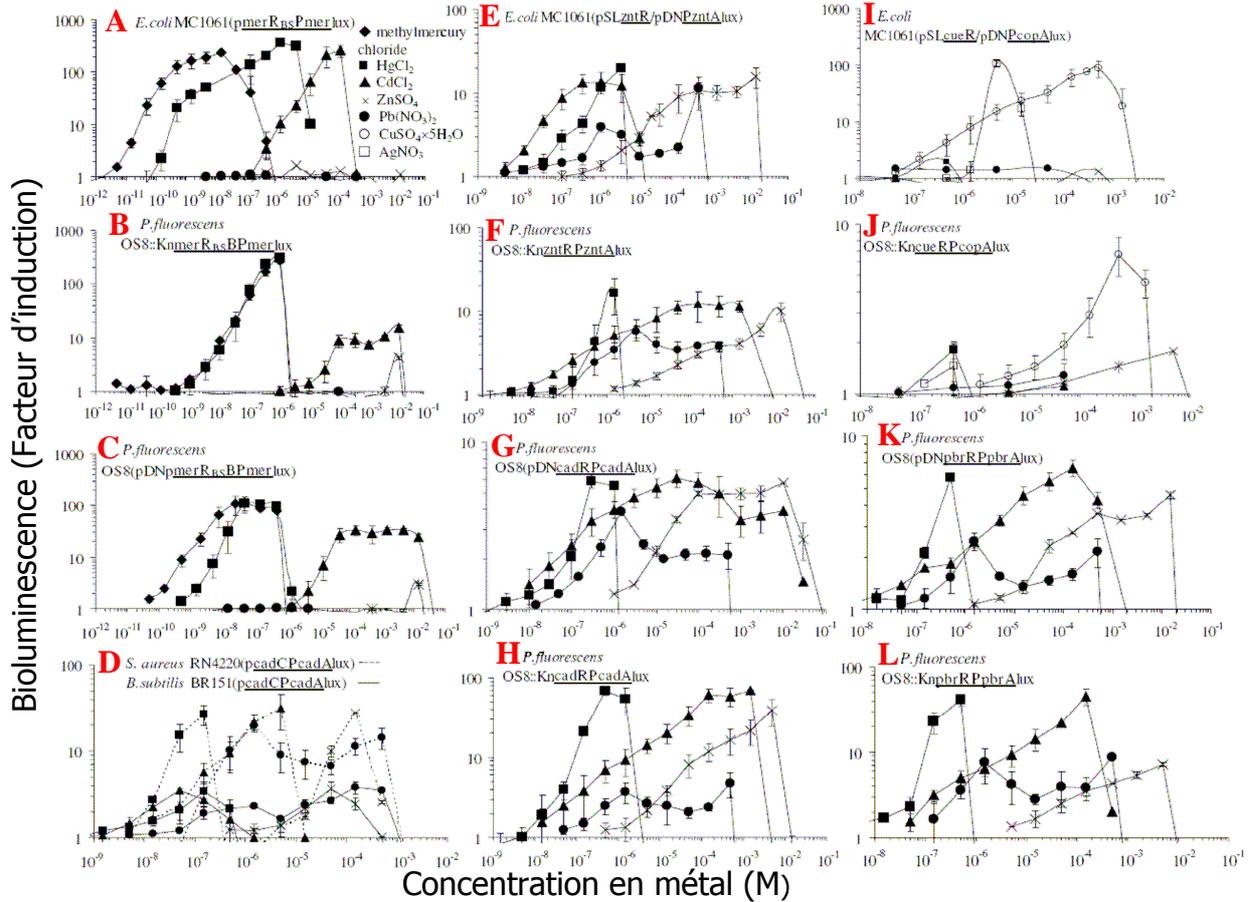


FIGURE 12 : SPECIFICITE DES DIFFERENTS CAPTEURS BACTERIENS EXPOSES A DES METAUX LOURDS (IVASK ET AL. 2009).

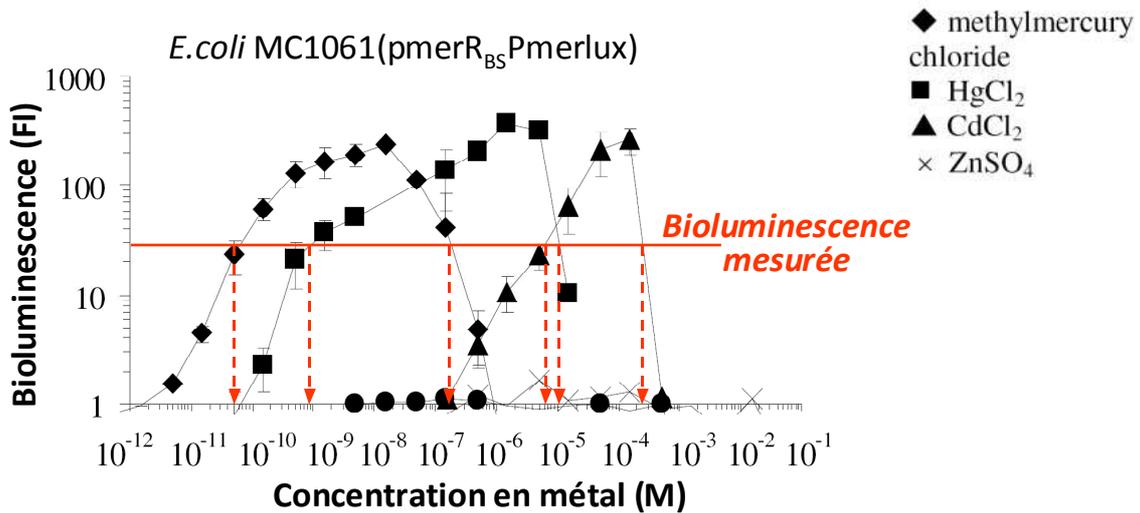


FIGURE 13 : INTERPRETATION DES DONNEES DE BIOLUMINESCENCE OBTENUE A PARTIR D'UN ECHANTILLON INCONNU.

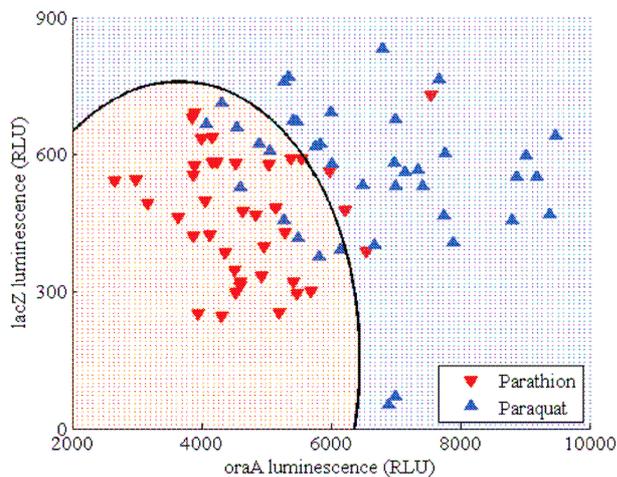
— : Bioluminescence induite suite à l'exposition de la souche bactérienne à l'échantillon  
 - - - -> : Métal et concentration potentiellement présent dans l'échantillon  
 FI : Facteur d'induction

Dans ce cas, l'interprétation se révèle être beaucoup plus ardue. En effet, un même niveau de bioluminescence mesurée (dans cet exemple, bioluminescence mesurée (FI) = 30) peut être la résultante de six conditions possibles « métal unique/concentration » :

- soit chlorure de méthyl-mercure à  $5.10^{-11}M$
- soit chlorure de mercure à  $8.10^{-10}M$
- soit chlorure de méthyl-mercure à  $2.10^{-7}M$
- soit chlorure de cadmium à  $6.10^{-6}M$
- soit chlorure de mercure à  $1.10^{-5}M$
- soit chlorure de cadmium à  $2.10^{-4}M$

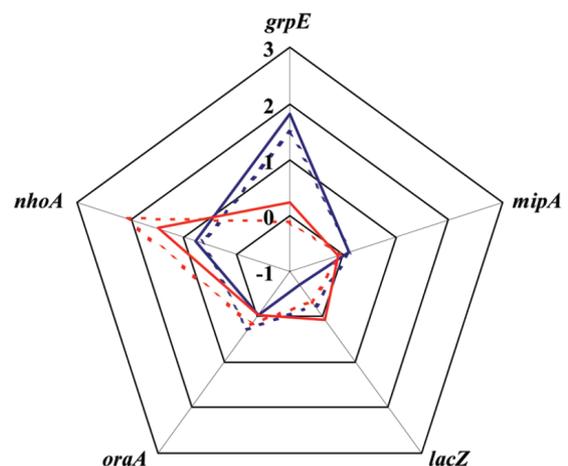
La difficulté réside donc dans l'interprétation des données de bioluminescence fournies par les capteurs bactériens inductibles.

A notre connaissance, la littérature disponible propre à l'interprétation des données de bioluminescence est quasi-inexistante. Deux études, quasiment similaires, ont toutefois été réalisées par Ben-Israel *et al.* (1998) et Elad *et al.* (2008), visant à identifier des composés toxiques à partir d'un panel de bioéléments bactériens bioluminescents associé à un modèle d'algorithme de classification. D'après l'étude la plus récente, cette association bio-statistique permet d'identifier les composés présents avec un taux d'erreur qui n'excède pas 3% (Figure 14 et 15) (étude réalisée sur 5 composés chimiques et 5 souches bactériennes recombinantes).



**FIGURE 14 :** DISCRIMINATION DU PARAQUAT (20mg/L) ET DU PARATHION (500mg/L) BASEE SUR DEUX CAPTEURS BACTERIENS *E.COLI* *ORA A'::LUXCDABE* ET *LAC Z'::LUXCDABE* GRACE A LA THEORIE DE DECISION BAYESIENNE.

oraA luminescence (RLU) : Bioluminescence relative émise par la souche *E.coli oraA'::luxCDABE*  
 lacZ luminescence (RLU) : Bioluminescence relative émise par la souche *E.coli lacZ'::luxCDABE*



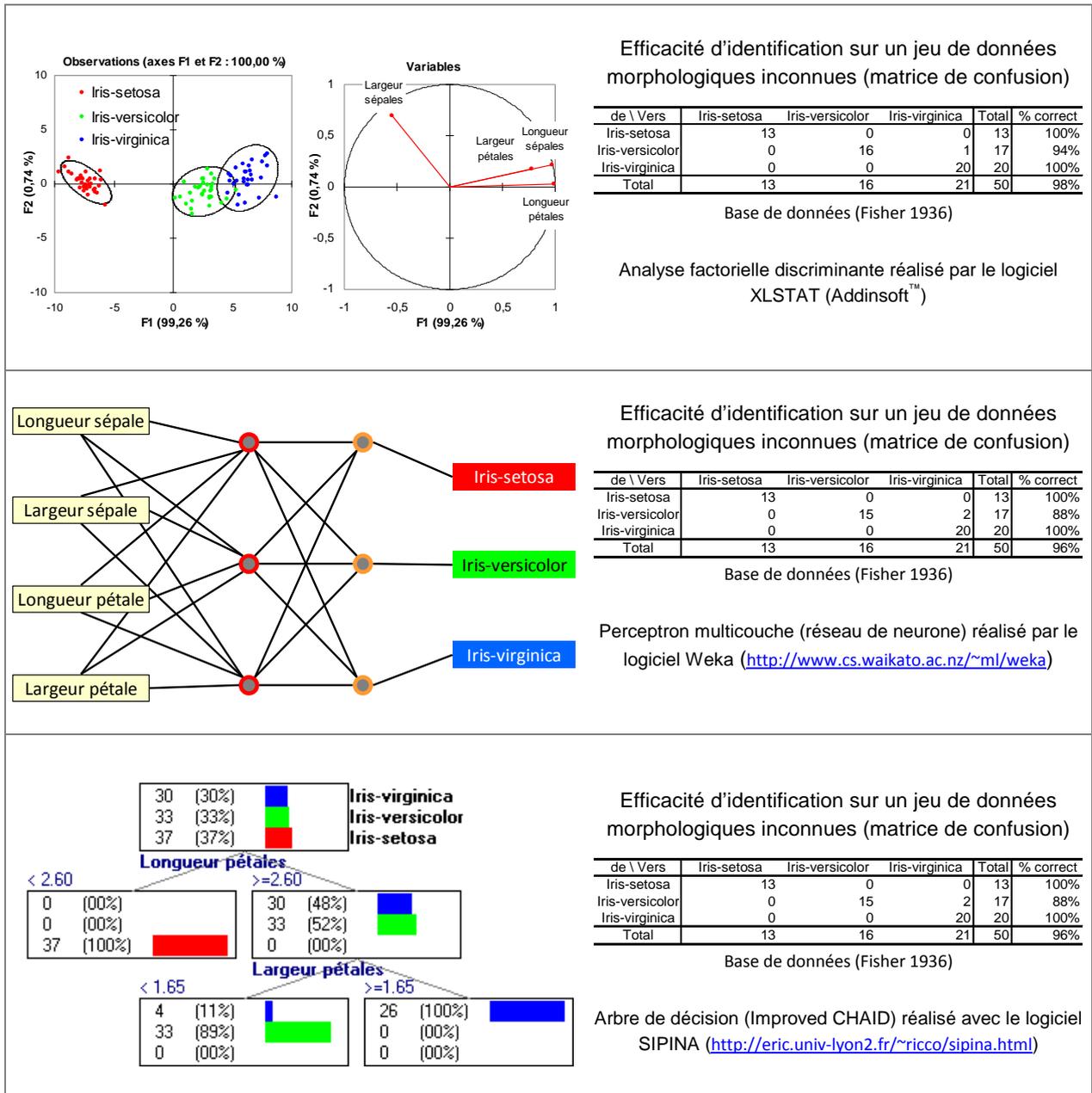
**FIGURE 15 :** EMPREINTE BIOLUMINESCENTE DU POTASSIUM CYANIDE -20mg/L-(TRAIT BLEU POINTILLE : MILIEU DE LABORATOIRE, PLEIN : EAU BRUTE) ET DU PARAQUAT -31.25mg/L- (TRAIT ROUGE POINTILLE : MILIEU DE LABORATOIRE, PLEIN : EAU BRUTE) EN FONCTION DES BIOELEMENTS RAPORTEURS.

oraA : *E.coli oraA'::luxCDABE* ; lacZ : *E.coli lacZ'::luxCDABE*  
 nhoA : *E.coli nhoA'::luxCDABE* ; grpE : *E.coli grpE'::luxCDABE*  
 mipA : *E.coli mipA'::luxCDABE*

Cependant, certains éléments ne sont pas abordés dans ces articles. Les auteurs ne prennent pas en compte le facteur « concentration du polluant » qui joue un rôle prépondérant dans l'induction de la bioluminescence tant au niveau de l'intensité qu'au niveau de la cinétique de la réponse. De plus, la question des mélanges (plusieurs composés dans un même échantillon) n'est pas, ou très peu, abordée, écartant ainsi tous phénomènes potentiels d'interactions entre les composés (synergisme, antagonisme).

Tout l'enjeu du développement d'un outil efficace d'identification réside dans l'intégration de ces notions de mélange, de concentration et d'interaction. Aussi, pour répondre à cette problématique, nous nous sommes tournés vers d'autres domaines scientifiques, susceptibles d'utiliser des outils statistiques dans le but d'identifier un (ou plusieurs) paramètre(s) en fonction des variables mesurées : diagnostic médical, perception sensorielle, évaluation des risques, modélisation climatique,... Parmi les outils décrits, l'analyse factorielle discriminante (AFD ou linear discriminant analysis LDA), les réseaux de neurones et les arbres de décision sont les plus répandus (Zhu *et al.* 1997). Nous avons cherché à les comparer. Pour cela, les trois méthodes d'identification ont été appliquées sur un même jeu de données de référence : les « Iris de Fisher » (Fisher 1936), matrice composée de 150 données associant espèces florales (*Iris setosa*, *Iris versicolor* et *Iris virginica*) et paramètres morphologiques (tailles des sépales et pétales). L'enjeu était d'évaluer la capacité à identifier l'espèce florale en fonction des caractéristiques morphologiques mesurés. La figure 16 représente les résultats de discrimination obtenus à partir de ce jeu de données.

Avec ce jeu de données, les efficacités d'identification propres aux trois méthodes sont similaires (96-98%), toutefois, dans le cadre de notre étude, le choix s'est orienté vers la méthode d'identification par arbres de décision pour des raisons de simplicité, de lisibilité et de flexibilité. En effet, cette approche graphique permet de comprendre et de contrôler visuellement le cheminement mis en œuvre pour l'identification. Dans l'exemple présenté, les facteurs prépondérants à l'identification des espèces florales par arbre de décision sont les paramètres « Longueur des pétales » et « Largeur des pétales ».



**FIGURE 16 :** REPRESENTATIONS GRAPHIQUES ET LEURS EFFICACITES D'IDENTIFICATION EN FONCTION DES METHODES STATISTIQUES EMPLOYEES (DONNEES TRAITES DANS LE CADRE DE CETTE THESE).

Echantillon d'apprentissage : n=100  
 Echantillon d'évaluation : n=50

### 1.3.1. Arbre de décision : principe général

Un arbre de décision, ou graphe d'induction, est un outil d'aide à la décision et à l'exploration de données visant à étudier et à comprendre les relations entre des variables étudiées et leurs facteurs explicatifs. C'est en quelque sorte une approche, relativement ancienne (Morgan and Sonquist 1963), de l'intelligence artificielle au sens large car il s'agit ici d'apprentissage supervisé. Un arbre de décision permet de modéliser simplement, graphiquement et rapidement un phénomène mesuré plus ou moins complexe. Sa lisibilité, sa rapidité

d'exécution et le peu d'hypothèses nécessaires a priori peuvent expliquer sa popularité actuelle.

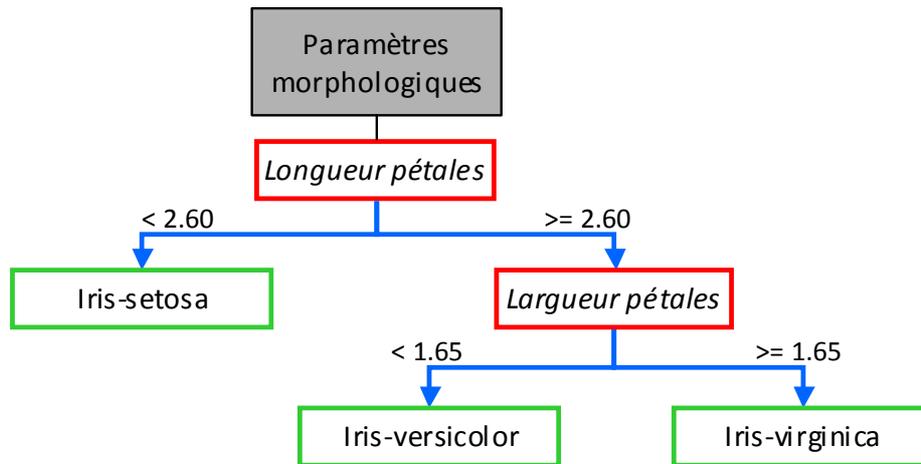


FIGURE 17 : CONSTITUANTS D'UN ARBRE DE DECISION

Un arbre de décision (Figure 17) est constitué de trois types d'éléments : les **nœuds**, les **arcs** et les **feuilles**. Chaque nœud est associé à un facteur évalué et chaque arc issu de ce nœud est associé à une caractéristique de ce facteur. Les feuilles, nœuds sans arc sortant, correspondent aux réponses à la question initialement posée, ici « A quelle espèce d'iris appartient cette plante ? ».

Les algorithmes<sup>4</sup> de construction d'arbres de décision à partir d'une matrice de données d'apprentissage procèdent tous de manière équivalente. Les arbres sont construits de façon descendante, de la racine (sommet de l'arbre informatique) vers les feuilles qui constituent les bases de l'arbre informatique, selon les règles générales de l'algorithme de classification choisi (Marsala 1998).

### 1.3.2. Algorithme d'induction des arbres de décision

Les statisticiens attribuent la paternité de la méthode des arbres de décision à Morgan et Sonquist (1963), qui ont été des précurseurs dans le domaine de la prédiction et de l'exploration de données à l'aide d'arbre de régression (équivalent aux arbres de classification mis à part la variable prédite qui est continue et non discrète). Suite à ces travaux, de nombreux algorithmes de classification ont été développés :

- ID3 (Induction of Decision Tree) est un algorithme qui a été publié en 1979 (Quinlan). Le choix des nœuds (facteurs prédictifs et valeurs de segmentation) repose sur la mesure de l'*entropie de Shannon*. Plus cette valeur est élevée, moins le nœud est discriminant. Cette méthode est à l'origine d'autres algorithmes comme C4.5 (Quinlan 1993), une référence dans ce domaine, ou encore C5.0 (autre évolution de ID3) qui est implanté dans un logiciel commercial.

<sup>4</sup> Ensemble de règles opératoires dont l'application permet de résoudre un problème énoncé au moyen d'un nombre fini d'opérations.

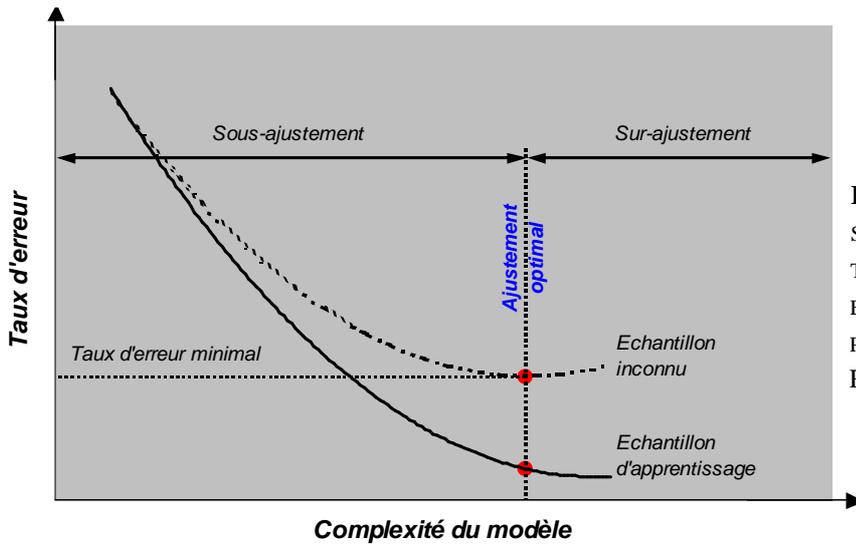
- L'algorithme CART (Classification And Regression Tree) a été développé et publié par Breiman (Breiman *et al.* 1984). Ici, la segmentation est réalisée de manière binaire en s'appuyant sur l' *indice de Gini*. Cette valeur varie entre 0 et 1, où 1 indique un nœud parfaitement discriminant et 0 un nœud qui ne permet aucune discrimination.
- La méthode CHAID (CHi-squared Automatic Interaction Detector) est un algorithme développé par Kass (1980). Pour évaluer la pertinence de la variable dans la segmentation, CHAID propose d'utiliser le Khi-2 d'écart à l'indépendance, bien connu en statistique. La valeur du Khi<sup>2</sup> ( $\chi^2$ ) varie entre 0 et  $+\infty$ , avec 0 qui signifie : pas de différence entre les échantillons (nœud non discriminant). Cet indice n'est pas toujours aisé à manipuler car il « avantage » les descripteurs ayant un nombre élevé de modalités. Aussi, afin de faciliter la détermination des critères de segmentation, il est préférable de normaliser cet indicateur par le nombre de degrés de liberté. C'est le cas de l'algorithme Improved CHAID (Rakotomalala 2005) qui normalise en utilisant le  $t$  de Tschuprow ainsi, l'indice obtenu varie entre 0 et 1.

D'autres algorithmes, moins répandus, existent mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. L'ensemble des méthodes décrites actuellement met l'accent sur tel ou tel aspect de la détermination de la variable de segmentation, toutefois, il n'existe pas d'algorithme qui soit dans la pratique systématiquement plus performant.

### 1.3.3. Limites de l'approche par arbres de décision

La principale limite dans la construction d'un arbre de décision concerne le dimensionnement des branches qui le composent (Breiman *et al.* 1984). L'enjeu est de trouver le meilleur compromis permettant de capter l'information utile, autrement dit les relations entre les variables décrites et les facteurs explicatifs, sans intégrer les spécificités propres à l'échantillon d'apprentissage, qui correspondent à des artefacts statistiques.

En effet, la construction des arbres repose entièrement sur les données incluses dans la matrice d'apprentissage. Aussi, cette étape a pour but de concevoir un modèle exploratoire s'adaptant le mieux possible à ces données au risque de le sur-ajuster, c'est à dire de développer un modèle « parfait » qui toutefois, ne permet pas de mettre en évidence les véritables relations entre les variables et leurs facteurs. Poussée à l'extrême, cette étape de conception peut engendrer des modèles complexes composés d'autant de branches qu'il y a de données dans la matrice d'apprentissage. Cependant en aucun cas, ceux ci ne pourront être extrapolés à de nouvelles données. A l'inverse, un arbre trop « simple » (sous-ajustement) peut également rencontrer des difficultés d'extrapolation car il ne reflète pas suffisamment les données, et par conséquent n'est pas non plus représentatif des relations variables/facteurs. La figure 18 illustre ses deux phénomènes de sous et sur-ajustement. A mesure que la taille de l'arbre augmente (complexité), le taux d'erreur calculé à partir de l'échantillon d'apprentissage diminue jusqu'à s'annuler. En revanche, le taux d'erreur calculé à partir d'un autre jeu de données (échantillon inconnu) diminue dans un premier temps (zone de sous-ajustement) jusqu'à une limite de complexité au delà de laquelle on observe un accroissement de ce taux (zone de sur-ajustement).



**FIGURE 18 :** PHENOMENES DE SOUS-AJUSTEMENT ET SUR-AJUSTEMENT DES MODELES : ARBITRAGE ENTRE TAUX D'ERREUR ET COMPLEXITE (ADAPTEE DE RAKOTOMALALA, 2005).

Selon le principe de parcimonie<sup>5</sup>, la taille d'un arbre est inversement corrélée avec sa stabilité de prédiction sur de nouvelles données. L'enjeu est donc de trouver un arbre qui associe une taille réduite à des performances optimales. Pour cela deux stratégies d'élagage peuvent être mises en œuvre :

- Le *pré-élagage*, qui consiste à fixer des critères d'arrêt à l'expansion du modèle. Ces critères peuvent correspondre à des effectifs minimum ou des niveaux de pureté des feuilles au delà desquels la segmentation des branches n'est plus nécessaire.
- Le *post-élagage*, qui consiste, dans un premier temps, à produire un arbre pur à partir d'une fraction de la matrice de données d'apprentissage pour ensuite passer à une étape de réduction de l'arbre en s'appuyant sur l'autre fraction des données de la matrice de manière à optimiser les performances du modèle.

#### 1.4. Conclusion

Dans le cadre de cette étude bibliographique, nous avons démontré que les biocapteurs bactériens bioluminescents pouvaient être des outils intéressants en complément des méthodes chimiques traditionnelles. Les arguments avancés concernent plus particulièrement la nature des capteurs qui permet une approche plus « biologique » des pollutions. En effet, l'objectif n'est plus de quantifier la concentration totale d'un polluant mais de s'attacher plus particulièrement à sa fraction biodisponible (fraction assimilable qui présente le plus de risque pour l'organisme vivant exposé).

Malgré les intérêts analytiques que présentent ces nouveaux outils biologiques, certains verrous ralentissent leurs développements. En effet, cette synthèse bibliographique révèle des difficultés quant à l'utilisation des bioéléments bactériens inductibles. Les nombreuses études publiées sur la caractérisation de ces bioéléments mettent en évidence la faible spécificité de ces capteurs biologiques rendant ainsi l'interprétation des résultats particulièrement délicate.

<sup>5</sup> Principe consistant à n'utiliser que le minimum de causes élémentaires pour expliquer un phénomène.

Aussi, le premier point abordé dans cette thèse vise à améliorer la lecture des données en proposant un modèle d'aide à l'interprétation associant réponse bactérienne et analyse statistique.

De plus, le nombre de biocapteurs bactériens bioluminescents recensés reste assez limité. Pour beaucoup d'entre eux, le développement se limite à l'étude de la faisabilité sans caractérisation pertinente des performances ni applications à l'environnement. Le second point abordé au cours de ces travaux vise donc à aborder ces applications au travers du biocapteur Lumisens III (biocapteur bactérien multicanal en phase immobilisé développé au sein du laboratoire par T.Charrier). L'enjeu est d'une part, de caractériser ce système d'un point de vue biologique (stabilité du signal dans le temps, durée d'utilisation, évolution physiologique des capteurs bactériens) et d'autre part, d'évaluer sa pertinence dans le cadre du suivi de l'environnement.

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

---

## 2.1. Biocapteur : Lumisens III

Le biocapteur Lumisens III a été développé au cours la thèse de T. Charrier (Charrier 2006). C'est un système de mesure de la bioluminescence reposant sur des micro-organismes bactériens modifiés capables de révéler la présence de certains métaux. La figure 19 représente le principe de fonctionnement du biocapteur.

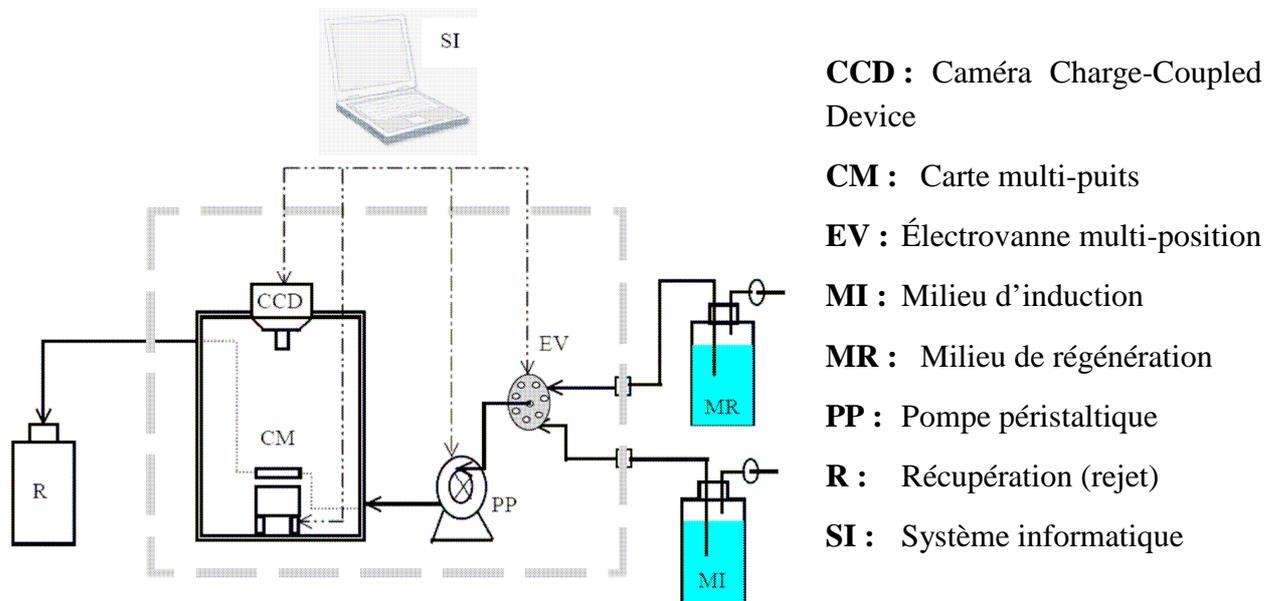


FIGURE 19 : SCHEMA GENERAL DU BIOCAPTEUR LUMISENS III

### 2.1.1. Carte multi-puits

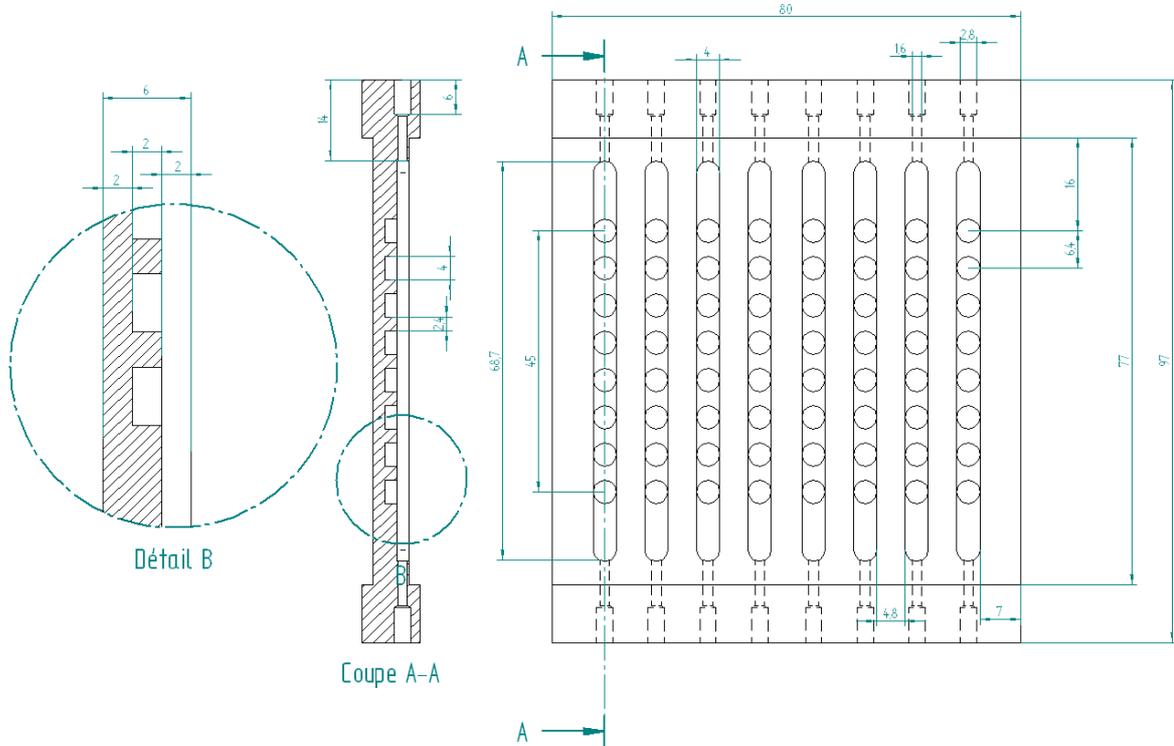
Les bactéries bioluminescentes sont immobilisées dans une matrice solide d'agarose au sein d'une carte multi-puits (CM). Cette dernière est placée au cœur du système, à l'intérieur de la chambre de mesure, face au transducteur optique (Camera CCD refroidie) permettant ainsi une capture optimale de la bioluminescence produite par les bactéries. La carte assure les transferts physico-chimiques entre les bactéries immobilisées et le milieu circulant (oxygène, nutriment, polluant,...).

Au cours de cette étude, 2 cartes ont été utilisées : une carte multi-canal composée de 8 canaux distincts contenant chacun 8 puits en série et une carte mono-canal composée d'une seule voie mais constituée de 16 puits en série. La géométrie des cartes ainsi que le matériau dont elles sont composées (Nylon), ont été étudiés et optimisés au cours des travaux de M. Affi (Affi *et al.* 2009).

L'étanchéité des 2 types de cartes est assurée par un film électrostatique transparent (Thermo-Scientific<sup>®</sup>, Adhesive seal, AB-1170). Ce film est collé sur la face supérieure de la carte permettant une fermeture hermétique des différents canaux de circulation des fluides.

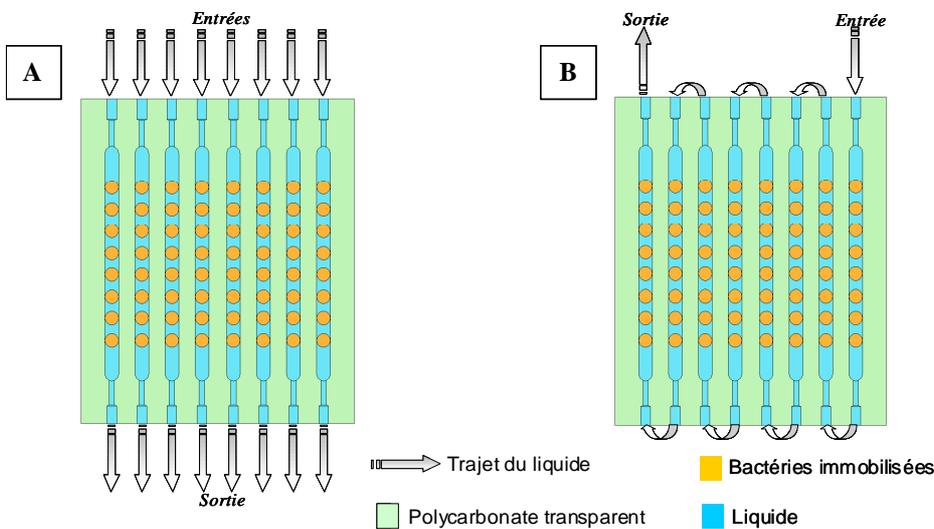
2.1.1.1. Carte 1 : Multi-canal

La carte multi-canal est une carte de 64 puits réparties sur 8 canaux de circulation distincts (figure 20). Chaque canal est indépendant et peut être soumis à des conditions expérimentales spécifiques.



**FIGURE 20 :** PLAN DE LA CARTE MULTI-CANAL (COTES EN MILLIMETRES) . VUE DE DESSUS, COUPE TRANSVERSALE D’UN CANAL (COUPE A-A) ET VUE DETAILLEE D’UN PUIT (DETAIL B).

Toutefois, la carte peut également être utilisée dans une configuration « mono-canal » à condition de connecter l’ensemble des canaux entre eux. Cette configuration a été utilisée afin de faciliter l’étude de la croissance bactérienne au sein de la carte dans le biocapteur Lumisens III (figure 21).



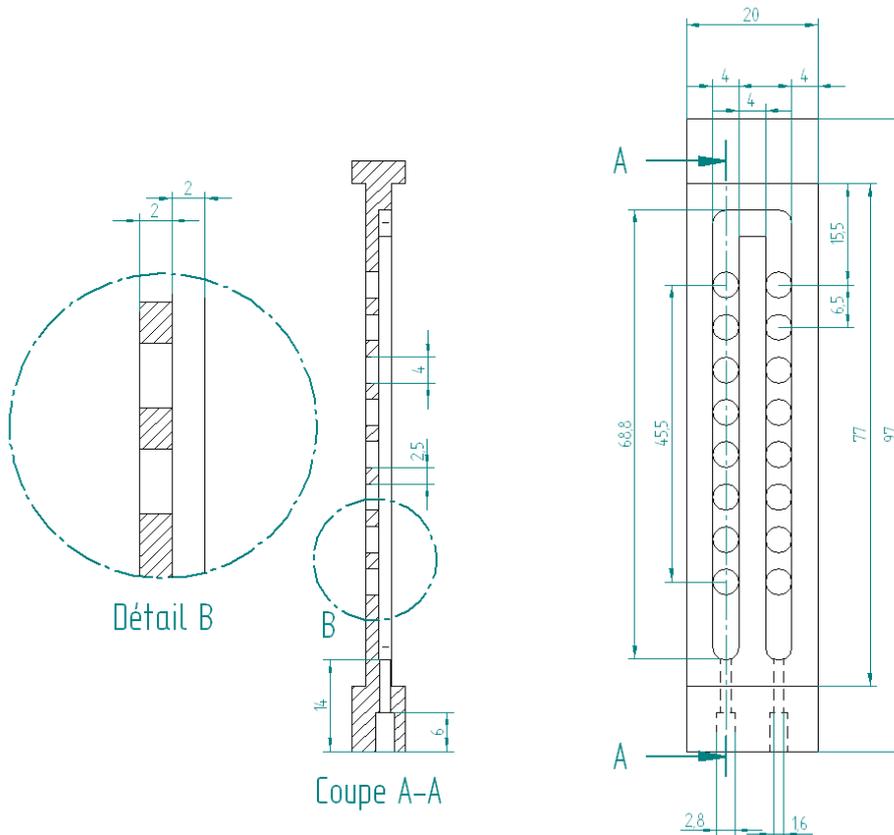
**FIGURE 21 :** CARTE MULTI-CANAL DANS LES 2 CONFIGURATIONS

**A :** Configuration « multi-canal » : 8 canaux contenant chacun 8 puits.

**B :** Configuration « mono-canal » : 1 canal contenant 64 puits.

## 2.1.1.2. Carte 2 : Mono-canal

Plusieurs exemplaires de cette carte ont été réalisés afin de faciliter les expériences longues d'induction en biocapteur. 16 puits sont présents au sein de la carte et répartis équitablement tout au long du canal (figure 22).



**FIGURE 22 :** PLAN DE LA CARTE MONO-CANAL (COTES EN MILLIMETRES) . VUE DE DESSUS, COUPE TRANSVERSALE D'UN CANAL (COUPE A-A) ET VUE DETAILLEE D'UN PUIT (DETAIL B).

Dans le cas de cette carte, un film transparent est collé sur les deux faces de la carte. Un film sur la face supérieure de la carte afin de fermer hermétiquement le canal de circulation et un film sur la face inférieure de la carte afin de fermer les puits sans fonds.

## 2.1.2. Suivi de l'oxygène consommé par les bactéries

L'oxygène dissous étant un facteur prépondérant dans la réaction de bioluminescence, nous avons choisi de suivre ce paramètre au sein du biocapteur. L'enjeu était d'améliorer la compréhension de l'évolution de la bioluminescence bactérienne au cours du temps dans le biosystème.

Le suivi de l'oxygène a été réalisé à l'aide de 2 micro-sondes (OX-N50, Unisense<sup>®</sup>) de 0,8mm de diamètre. Un système étanche pour le suivi de l'oxygène en continu a également été développé à l'aide d'un logiciel de CAO (Solid Edge<sup>®</sup> Version 10.00.00.50). Ces 2 sondes ont été placées dans le canal de fluide en entrée et en sortie de la carte de mesure afin d'évaluer la quantité d'oxygène consommée par les bactéries au cours du temps (figure 23).

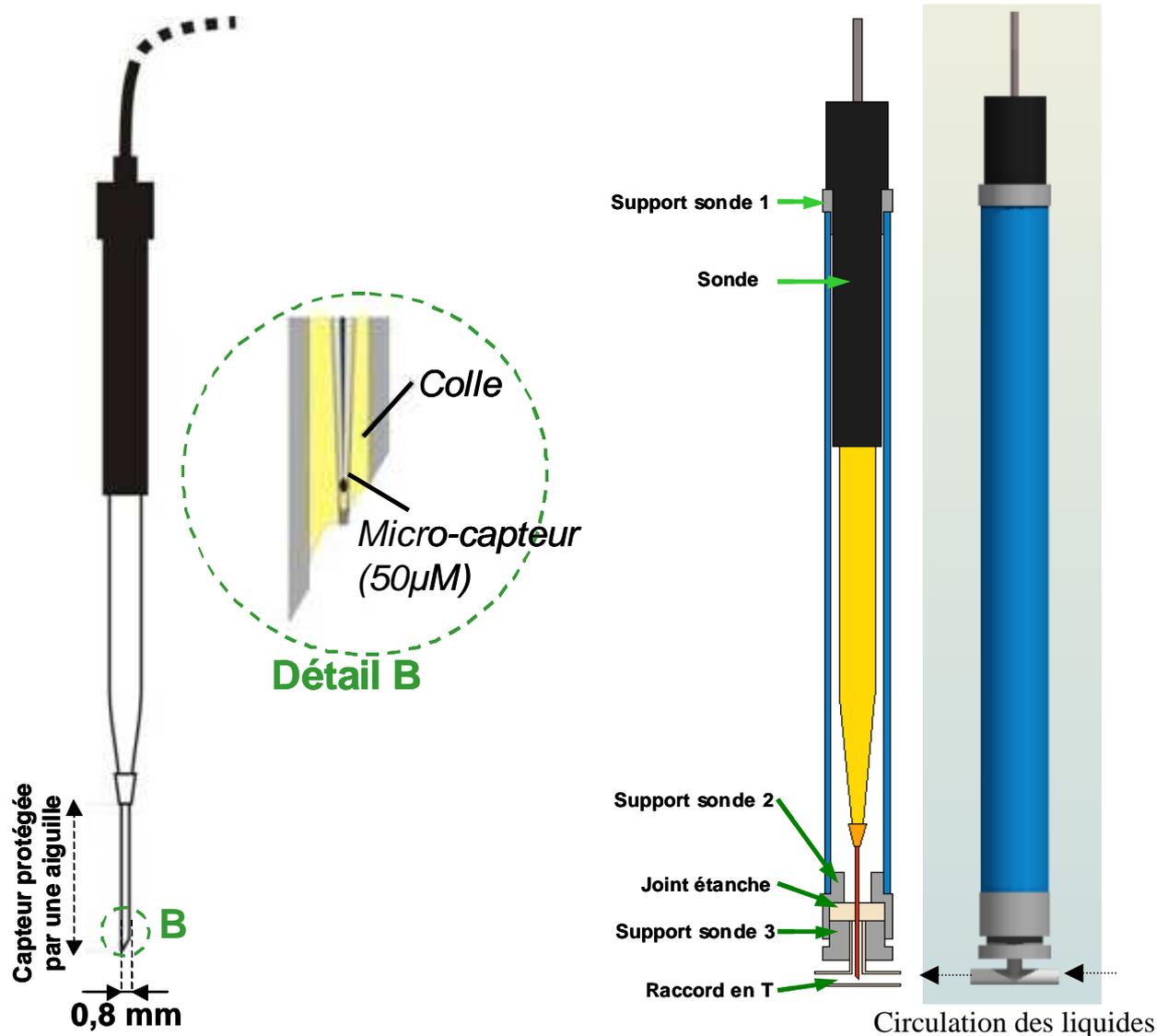


FIGURE 23 : MICROSONDE UTILISEE ET SYSTEME DEVELOPPE POUR LE SUIVI DE L' OXYGENE.

Pour cette étude, les concentrations d'entrée et de sortie ont été mesurées automatiquement toutes les cinq minutes durant toute la durée de l'expérience (11 jours) via le logiciel SensorTrace BASIC V.2.0.1 (Unisense<sup>®</sup>).

### 2.1.3. Stérilisation du matériel

L'ensemble des éléments du circuit de circulation des liquides est stérilisé préalablement afin de limiter l'apparition de contaminant biologique dans le système. Pour cela, l'ensemble des connecteurs en polypropylène (Fisher Scientific<sup>®</sup>, 95901 et 95097) et des tubes Tygon<sup>®</sup> (Fisher Scientific<sup>®</sup>, 71102) sont autoclavés durant 30 minutes à 100°C. Les cartes de mesures et les tubes en verre utilisés lors de l'immobilisation des bactéries sont également stérilisés. Les tubes Tygon<sup>®</sup> (Fisher Scientific<sup>®</sup>, 31612) spécifiques à la pompe péristaltique sont lavés à l'alcool (95°) et séchés sous les ultra-violetts. Ces derniers ne sont pas stérilisés à l'autoclave afin de conserver leurs propriétés mécaniques. L'ensemble des éléments constituant le circuit fluide est repris dans le tableau 11.

### 2.1.4. Installation du circuit fluide.

La circulation des liquides est assurée par une pompe péristaltique à 8 galets (WATSON-MARLOW BREDEL PUMPS, 205S). Le débit imposé par la pompe est de 2ml.min<sup>-1</sup> (soit 41,3rpm avec des tubes Tygon® W31612).

L'ensemble du circuit fluide est assemblé stérilement sous une hotte à flux laminaire avant d'être mis en place dans le biocapteur Lumisens III (figure 24). Pour éviter les risques de contamination, un tube provisoire stérile (N°bis) est placé à l'emplacement des sondes lors du transfert vers le biocapteur. Lors de la mise en place, ce tube laisse place aux micro-sondes.

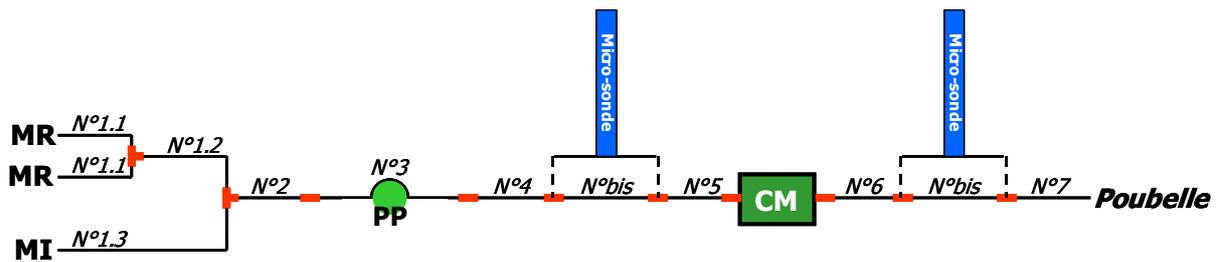


FIGURE 24 : SCHEMA DE MONTAGE DU CIRCUIT FLUIDIQUE POUR UNE CARTE MONO-CANAL.

MR : Milieu de régénération

MI : Milieu d'induction

PP : Pompe péristaltique

N°X : Numéro du tube (Cf : Tableau 11)

 : Raccord en T

 : Raccord droit

CM : Carte de mesure

TABLEAU 11 : RECAPITULATIF DES ELEMENTS COMPOSANT LE CIRCUIT FLUIDIQUE POUR UNE CARTE DE MESURE.

TUBULURE			
N° du Tube	Longueur (cm)	Quantité	Référence (Fisher Scientific®)
N°1.1	20	2	W71102
N°1.2	20	1	W71102
N°1.3	40	1	W71102
N°2	25	1	W71102
N°3	40	1	W31612
N°4	35	1	W71102
N°bis	5	2	W71102
N°5	25	1	W71102
N°6	20	1	W71102
N°7	40	1	W71102

CONNECTEUR			
Type	Quantité	Symbole	Référence (Fisher Scientific®)
Raccord droit	9		W95901
Raccord en T	2		W95907

Une fois le circuit installé, les milieux de circulations sont préparés (MR : milieu acétate dilué au dixième Ac 1/10 contenant 50µg/ml d'ampicilline, MI : milieu acétate dilué au dixième Ac 1/10 contenant 50µg/ml d'ampicilline ainsi que la concentration souhaitée de polluant) puis connectés stérilement au réseau fluide du biocapteur.

#### **2.1.5. Immobilisation des bactéries au sein de la carte de mesure.**

Une solution d'agarose à 4% (P/V) (Sigma<sup>®</sup>, A0701) est également préparée dans du milieu de culture stérile. Pour cela, 0,16g d'agarose sont ajoutés dans 4 ml de milieu et chauffés au micro-onde quelques secondes (environ 90-100°C) afin de solubiliser l'agarose. La suspension homogène est répartie dans des tubes en verre stériles thermostatés à 35°C par un bain à sec à hauteur de 500µl par tube. La solution est conservée une quinzaine de minutes à 35°C avant l'ajout des bactéries.

A partir d'une culture bactérienne (cf. paragraphe 2.4.3), une dilution est réalisée dans du milieu de culture stérile afin d'obtenir une suspension bactérienne ayant une  $A_{620nm}=0,2$ .

500µl de suspension bactérienne sont ajoutés aux 500µl d'agarose à 35°C afin d'obtenir une suspension homogène finale à  $A_{620nm}=0,1$  avec une concentration d'agarose à 2%. Ce gel est ensuite déposé dans chaque puits de la carte à l'aide d'une micro-pipette à déplacement positif à hauteur de 25µl par puits.

La carte est ensuite scellée hermétiquement à l'aide d'un film transparent électrostatique (Thermo-Scientific<sup>®</sup>, Adhesive seal, AB1170) et mise en place dans le biocapteur.

Pour la carte mono-canal, un film transparent est collé préalablement sur la face inférieure de la carte afin de se substituer à l'épaisseur manquante sous les puits. Les gels sont coulés directement dans les puits sur ce film transparent.

#### **2.1.6. Capture et analyse de la bioluminescence bactérienne.**

La capture de la bioluminescence produite par les bactéries immobilisées dans la carte est réalisée à l'aide d'un capteur CCD (Charge-Coupled Device, ou dispositif à transfert de charge, Diagnostic Instruments inc., RT<sup>®</sup> SE6 Monochrome) équipée d'un objectif ayant une distance focale de 30 cm. Ce capteur photo-sensible est installé en surplomb de la carte de mesure au sein même de la chambre noire permettant ainsi une capture globale et optimale de l'ensemble de la surface de la carte de mesure.

Cette capture est gérée informatiquement par un logiciel dédié (Diagnostic Instruments inc., SPOT<sup>™</sup> V.4.6.4.2) qui permet de contrôler l'ensemble des paramètres de la mesure (durée de l'intégration, sensibilité du capteur, gain,...). Avant chaque expérience, plusieurs captures sont réalisées avec la carte de mesure sans les bactéries. Cette étape préliminaire permet de mesurer le bruit de fond du système et de le déduire des captures suivantes avec les bactéries. Cette première étape de traitement est également réalisée par ce logiciel. Les images sont fournies au format TIF.

Dans un second temps, les images obtenues sont traitées via le logiciel d'analyse d'image KODAK<sup>®</sup> 1D (KODAK Scientific imaging systems, Kodak<sup>®</sup> 1D V.3.6.5 K2). Un masque est réalisé pour chaque type de carte et est appliqué sur les images afin de déterminer la quantité de lumière émise par chaque puits de(des) carte(s). La quantification de la bioluminescence est réalisée en comptant les valeurs de chaque pixel (la valeur des pixels dépend de l'intensité lumineuse mesurée) contenu dans un puits.

## 2.2. Plasmides et souches bactériennes

L'ensemble des souches bactériennes utilisées sont dérivées de la transformation d'une souche de *Escherichia coli* K12 MG1655 transformée avec des plasmides déjà existants développés au laboratoire à l'exception du plasmide pBMerlux.

### 2.2.1. Stratégie de construction du plasmide pBMerlux

Le plasmide pBMerlux a été développé par H. Capioux, en parallèle de cette thèse. La stratégie de construction a consisté à cloner le promoteur *pMerT* et le gène régulateur *MerR* en amont des gènes *luxCDABE*. Ainsi en présence de l'induction, la protéine régulatrice MerR se complexe avec l'inducteur et lève l'inhibition du promoteur *pMerT* permettant ainsi la transcription et la traduction des gènes *luxCDABE*.

Cette construction a été réalisée dans un vecteur plasmidique et est reprise sur le schéma suivant (figure 25).

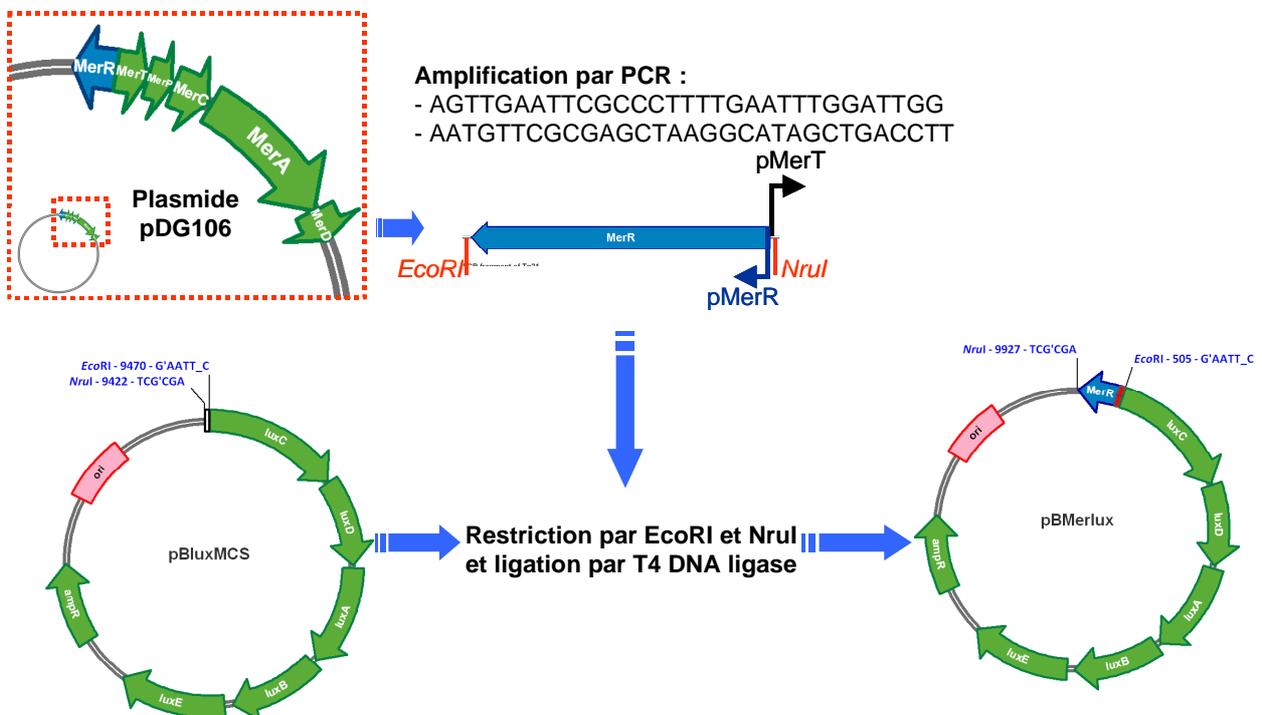


FIGURE 25 : STRATEGIE DE CLONAGE DU PLASMIDE PBMERLUX

### 2.2.2. Plasmides utilisés

L'ensemble des plasmides utilisés sont référencés dans le tableau 12.

**TABLEAU 12 :** PLASMIDES UTILISEES.

Nom du plasmide	Plasmide hôte	Système rapporteur	Promoteur	Régulateur	Résistance	Référence bibliographique
pBTAclux	pBtac2	Opéron <i>lux<sub>fisheri</sub></i> <sup>a</sup>	<i>ptac</i>	/	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
pBZntlux	pBTAclux <sup>b</sup>	Opéron <i>lux<sub>fisheri</sub></i> <sup>a</sup>	<i>pzntA</i>	/	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
pBCoplux	pBTAclux <sup>b</sup>	Opéron <i>lux<sub>fisheri</sub></i> <sup>a</sup>	<i>pcopA</i>	/	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
pBArslux	pBTAclux <sup>b</sup>	Opéron <i>lux<sub>fisheri</sub></i> <sup>a</sup>	<i>parsR</i>	<i>ArsR</i>	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
pBMerlux	pBluxMCS	Opéron <i>lux<sub>fisheri</sub></i> <sup>a</sup>	<i>pmerT</i>	<i>MerR</i>	Amp <sup>R</sup>	(Gambill and Summers 1985) (Gueuné 2007) Cette étude

<sup>a</sup> : Opéron *lux* issue de la souche bactérienne marine *Vibrio fischeri* et constitué des 5 gènes *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* et *luxE*.

<sup>b</sup> : Le promoteur *ptac* a été remplacé par le promoteur souhaité.

/ : Pas de gène régulateur apporté à la construction plasmidique.

### 2.2.3. Souches bactériennes

Les souches bactériennes qui ont été utilisées au cours de ces travaux sont répertoriées dans le tableau suivant ( tableau 13).

**TABLEAU 13 :** SOUCHES UTILISEES AU COURS DE LA THESE

Nom	Souche hôte (Génotype)	Plasmide	Résistance	Référence
<i>E.coli</i> DH1 pBZntlux		pBZntlux	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
<i>E.coli</i> DH1 pBArslux		pBArslux	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
<i>E.coli</i> DH1 pBCoplux	<i>E.coli</i> DH1 (F- <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> )	pBCoplux	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
<i>E.coli</i> DH1 pBMerlux		pBMerlux	Amp <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E.coli</i> DH1 pBTAclux		pBTAclux	Amp <sup>R</sup>	(Charrier 2006)
<i>E.coli</i> K12 MG1655	<i>E.coli</i> K12 MG1655 (F- $\lambda$ - <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> )	/	/	ATCC 700926

La souche *E.coli* DH1 pBTAclux exprime constitutivement la bioluminescence grâce au plasmide pBTAclux. En effet, l'opéron *luxCDABE* étant sous le contrôle du promoteur *ptac* est exprimé de manière continue. La souche *E.coli* K12 MG1655 est une souche plus proche de la souche sauvage (peu de mutation au niveau du génome). Cette souche est utilisée comme réceptrice des plasmides inductibles.

## 2.3. Milieux de culture, antibiotique, produits chimiques et échantillons environnementaux

### 2.3.1. Milieu de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés au cours de cette thèse sous forme liquide ou sous forme gélosée. La composition des milieux est reprise dans le tableau ci-dessous.

**TABLEAU 14 :** COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES UTILISES AU COURS DE CES TRAVAUX

Composition (g/L)	Fournisseur	Milieu Luria-Bertani (LB)	LB gélosé (LBG)	Milieu acétate (Ac 1X)	Ac 1X gélosé (AcG 1X)	Milieu acétate diluée au 1/10 (Ac 1/10)
Acétate de sodium trihydrate	Fluka®	/	/	2,835	2,283	0,2283
Chlorure d'ammonium	Merck®	/	/	0,1919	0,1919	0,01919
Di-potassium hydrogène-phosphate	Merck®	/	/	0,028	0,028	0,0028
Chlorure de sodium	Sigma Aldrich®	5	5	5	5	5
Extrait de levure	Biokar Diagnostics®	5	5	0,5	0,5	0,05
Tryptone	Biokar Diagnostics®	10	10	1	1	0,1
Agar bactériologique type E	Biokar Diagnostics®	/	15	/	15	/
Référence		(Atlas 1997)	(Atlas 1997)	(Charrier 2006)	(Charrier 2006)	(Charrier 2006)

Ces milieux sont préparés dans de l'eau distillée. Le pH des milieux acétate sont ajustés à 7 avec de l'acide chlorhydrique (1M, Sigma Aldrich®) ou de l'hydroxyde de sodium (1M, Sigma Aldrich®).

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave (120°C / 20min).

### 2.3.2. Antibiotique

#### 2.3.2.1. Ampicilline

Les bactéries utilisées contiennent dans leurs plasmides une résistance à l'ampicilline qui permet le maintien du plasmide dans les cellules bactériennes durant la phase de croissance. Cette résistance permet également de réduire les risques de contamination lors de la culture des bactéries ou durant les expérimentations en biocapteur.

L'antibiotique est introduit dans les milieux de culture après stérilisation à l'autoclave à une concentration de 50µg.ml<sup>-1</sup> ou 100µg.ml<sup>-1</sup>.

Pour 10 ml de solution concentrée d'ampicilline à 10% (M/V), 1g d'Ampicillin Sodium Salt (Sigma®, A0166) est ajouté dans 10 ml d'eau distillée. La solution est ensuite stérilisée par filtration sur membrane de 0,22µM et aliquotée à hauteur de 1 ml dans des tubes Eppendorf® de 1,5 ml. La solution est stockée jusqu'à 3 mois à -20°C.

### 2.3.3. Produits chimiques

#### 2.3.3.1. Solutions métalliques

Les métaux lourds sont utilisés pour les essais d'induction en bioessai ou en biocapteur. Dans un premier temps, les métaux sont préparés en solution concentrée, aliquotés en bouteille brune et stockés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à un an. Le tableau 15 décrit les modalités de préparation des différentes solutions mères de métaux utilisés.

**TABLEAU 15 :** PREPARATION DES SOLUTIONS MERES DE METAUX LOURDS

Métal	MM(g.mol <sup>-1</sup> )	Fournisseur	Solvant	[solution mère]	Masse ajoutée pour 10ml (g)
CdCl <sub>2</sub> , 2,5 H <sub>2</sub> O	228,34	Panreac	Eau distillée	1M	2,2834
AgNO <sub>3</sub>	169,87	Labogros	Eau distillée	1M	1,6987
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	294,19	Fluka	Eau distillée	0,5M	0,735
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> , 3H <sub>2</sub> O	379,34	Panreac	Eau distillée	1M	3,7934
CrCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	266,45	Aldrich	Eau distillée	0,5M	1,3323
NiSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	280,87	Prolabo	Eau distillée	1M	2,8087
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	197,8	Sigma	NaOH (2M)	1M	0,989
HgCl <sub>2</sub>	271,59	Fluka	Eau distillée	0,1M	0,2716
SnCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	225,63	Panreac	Ethanol à 99,9%	0,1M	0,22563
ZnCl <sub>2</sub>	136,28	Prolabo	HCl (30mM)	1M	1,3628
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	278,02	Labosi	Eau distillée	1M	2,78
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	249,68	Labosi	Eau distillée	1M	2,497
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	197,91	Carlo Erba	Eau distillée	1M	1,98
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	237,93	Labosi	Eau distillée	0,1M	0,2379
As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	229,84	Acros organics	HCl (2M)	0,1M	0,1149

Les solutions diluées, utilisées pour les essais de détection par les souches sensibles, sont préparées dans de l'eau distillée. Elles sont :

- soit aliquotées dans des tubes Eppendorf<sup>®</sup> de 2 ml et stockées à -20°C durant 3 mois.
- soit préparées extemporanément, juste avant les expérimentations et utilisées immédiatement. Dans ces conditions, les solutions diluées ne sont pas réutilisées.

#### 2.3.3.2. Solution de saccharose

Une solution de saccharose (Sigma<sup>®</sup>) est nécessaire pour la lyophilisation<sup>®</sup> des bactéries en microplaque. Cette solution est préparée le jour de l'expérience dans de l'eau distillée à une concentration de 24% (M/V). Elle est ensuite stérilisée par filtration sur membrane de 0,22µM.

### 2.3.3.3. Solution de $MgSO_4$

La solution de  $MgSO_4$  est préparée dans de l'eau distillée à une concentration de  $10^{-2}M$ . Pour 1 litre d'eau distillée, 2,46g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Sigma<sup>®</sup>) sont dissous. La solution est homogénéisée et stérilisée à l'autoclave à  $120^{\circ}C$  durant 20 minutes.

## 2.3.4. Echantillons environnementaux

### 2.3.4.1. Prélèvement et mesure in situ

Les différents prélèvements d'eau ont été effectués en accord avec la norme ISO 5667-3 (AFNOR-ISO.5667-3 2004). Ces derniers ont été réalisés dans des bouteilles en verre d'un litre préalablement lavée à l'acide (HCl 10% durant 12 heures, rinçage à l'eau ultra-pure et séchage). Durant le transport, les échantillons ont été maintenu au froid. Lors du prélèvement, un certain nombre d'éléments a été relevé :

- l'oxygène dissous (LDO10103, HQ40d, Hach Lange)
- la température (Sentix 41, Multiline P4, WTW)
- le pH (Sentix 41, Multiline P4, WTW)
- la conductimétrie (TetraCon<sup>®</sup> 325, Multiline P4, WTW)
- la turbidité (2100P Turbidimeter, Hach Lange)

Les caractéristiques des échantillons prélevés sont détaillées dans le paragraphe 4.5. *Validation des arbres de décision sur des matrices environnementales.*

### 2.3.4.2. Préparation d'échantillons contaminés

Afin de simuler des évènements de contamination environnementale par des métaux, nous avons ajouté dans certains échantillons, des concentrations définies de métaux (cadmium, arsenic, cuivre et/ou mercure).

### 2.3.4.3. Conservation des échantillons

Les échantillons ont ensuite été aliquotés, filtrés et/ou acidifiés avant d'être stockés (Tableau 16).

**TABLEAU 16 :** CONDITION DE STOCKAGE ET PRE-TRAITEMENT DES ECHANTILLONS.

	Stockage de l'échantillon brut	Stockage de l'échantillon filtré	Dosage biologique	Dosage du mercure *	Dosage de l'arsenic	Dosage du cuivre	Dosage du cadmium	Echantillon filtrée
Filtration sur $0,45 \mu M^F$		Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
Volume stocké	2 x 50ml	50 ml	2 x 15 ml	20ml	15ml	15ml	15ml	≈ 800ml
Température de stockage	-20°C	-20°C	-20°C	+4°C	-20°C	-20°C	-20°C	+4°C
Durée du stockage	2-3 mois	2-3 mois	2-3 mois	1 semaine	2-3 mois	2-3 mois	2-3 mois	1 semaine
Conditions particulières				Stockage à l'obscurité				

\* : Ajout d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique et d'or (selon les recommandations du laboratoire départemental d'analyse)

F : Filtre Pall®, GN-6 Metrical® MCE Membrane Disc Filters, référence 66278

#### 2.3.4.4. *Dosage chimique des métaux dans les échantillons environnementaux*

Dans le cadre de l'étude, nous nous sommes limités uniquement aux métaux pris en compte dans le développement du modèle biologique à savoir : le cadmium, le mercure, le cuivre et l'arsenic.

Les dosages du mercure et de l'arsenic ont été réalisés au Laboratoire Départemental d'Analyses de Vendée par le service « Micro-polluants minéraux ». Le dosage de l'arsenic a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique à génération d'hydrures (GH-SAA) en accord avec la norme ISO 11969. Le mercure a été dosé, selon la norme ISO 17294-2, par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS).

Les concentrations en cuivre et en cadmium ont été mesurées au laboratoire ISOMER de l'Université de Nantes en collaboration avec le Dr. J.C. Amiard. Le dosage du cuivre a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme (FAAS) alors que le dosage du cadmium a été effectué par spectrométrie d'absorption atomique à four graphite (GFAAS).

### 2.4. *Cultures bactériennes et conservation*

#### 2.4.1. **Isolement et conservation sur boîtes de pétri**

Avant toute expérience, les bactéries sont isolées sur boîtes de pétri contenant du milieu AcG 1X avec de l'ampicilline à  $100\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Les bactéries sont isolées à partir d'un cryotube conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cette technique permet de vérifier la pureté de la souche conservée et de l'acclimater au milieu de croissance. Les colonies obtenues sur boîte sont utilisées pour les pré-cultures bactériennes. Les isollements sur gélose sont stockés à  $4^{\circ}\text{C}$  et protégés des rayons ultra-violet et de l'oxygène jusqu'à 2 semaines.

#### 2.4.2. **Pré-culture bactériennes**

Afin de stabiliser et d'acclimater les bactéries dans le milieu choisi, une pré-culture durant toute une nuit des souches est indispensable dans ce milieu à leur température d'utilisation finale (généralement  $30^{\circ}\text{C}$ ).

Les milieux de pré-cultures sont identiques aux milieux de culture, les bactéries sontensemencées à partir des colonies isolées sur boîte de pétri. Les pré-cultures sont généralement réalisées en tube de 20ml ou en erlenmeyer de 100ml contenant respectivement 7ml et 20ml de milieu de culture. Afin d'exercer une pression de sélection, de l'ampicilline est généralement ajoutée au milieu à hauteur de  $50\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Après une nuit d'incubation à la température souhaitée et sous agitation (250rpm), la densité bactérienne est évaluée par mesure de l'absorbance à 620nm.

### 2.4.3. Culture des bactéries

Afin que les inocula bactériens soient comparables d'un point de vue physiologique, une culture est réalisée avant chaque expérience. Le milieu de culture choisi (généralement Ac 1X) avec ou sans antibiotique (ampicilline à  $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) estensemencé à partir de la pré-culture. L'absorbance initiale de la culture bactérienneensemencée doit être proche de 0,2 ou 0,075 selon les souches bactériennes. La culture est alors incubée durant quelques heures à la température souhaitée et sous agitation (250rpm) jusqu'à l'obtention de la densité bactérienne souhaitée (Tableau 17) :

- soit 0,45 qui correspond au milieu de phase exponentielle de croissance
- soit 0,18, uniquement pour *E.coli* DH1 pBTAclux qui correspond au pic de production de bioluminescence (cf. paragraphe 3.2.2.).

**TABLEAU 17 :** RECAPITULATIF DES CONDITIONS DE CULTURES DE SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES AU COURS DE CETTE THESE.

Souche bactérienne	$A_{620\text{nm}}$		Volume de culture (ml)	Ajout d'antibiotique
	$A_{\text{Initiale}}$	$A_{\text{Finale}}$		
<i>E.coli</i> DH1 pBZntlux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> K12 MG1655 pBZntlux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> DH1 pBArslux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> K12 MG1655 pBArslux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> DH1 pBMerlux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> K12 MG1655 pBMerlux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> DH1 pBCoplux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>E.coli</i> K12 MG1655 pBCoplux	0,2	0,45	15	Amp – $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<b><i>E.coli</i> DH1 pBTAclux</b>	<b>0,075</b>	<b>0,16</b>	<b>50</b>	<b>Amp – <math>50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math></b>
<i>E.coli</i> K12 MG1655	0,2	0,45	15	/

Amp : Ampicilline

/ : Pas d'antibiotique

### 2.4.4. Conservation des souches à - 80°C

Afin de conserver dans le temps les différentes souches bactériennes, ces dernières peuvent être stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 1 à 2 ans.

Pour cela, 800 $\mu\text{l}$  de glycérol pur et stérile sont ajoutés à 5ml de culture bactérienne fraîche. La solution est ensuite homogénéisée et aliquotée dans des cryotubes stériles de 1,8ml (Simport<sup>LTD</sup>) à hauteur de 1,5ml par tube. Les tubes sont ensuite placés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5. Méthode de suivi de la croissance bactérienne

### 2.5.1. Mesure de l'absorbance

La mesure de l'absorbance est un moyen rapide et efficace pour évaluer la densité cellulaire d'une culture ou pré-culture bactérienne.

La mesure de l'absorbance est réalisée à 620nm avec le spectrophotomètre U-1800 (HITACHI®). L'échantillon mesuré est placé dans une cuve en plastique de 1 cm de trajet optique (Ratiolab, ref.2712120), une autre cuve contenant le milieu de culture sans bactérie sert de référence. La mesure est valide à condition que l'absorbance de la culture mesurée soit comprise entre 0 et 0,8 afin de respecter la gamme de linéarité de la loi de Beer-Lambert. Au delà de 0,8, la culture doit être préalablement diluée.

### 2.5.2. Méthode des UFC (Unité Formant Colonie)

Le dénombrement par UFC est une méthode de quantification des bactéries. Cette méthode ne s'intéresse toutefois qu'aux bactéries viables et cultivables dans un échantillon. On considère que chaque unité (bactérie) forme une colonie après incubation sur boîte de pétri. L'observation macroscopique de l'aspect des colonies permet de différencier les colonies de bactéries contaminantes de celles que l'on veut quantifier.

Des dilutions sont réalisées à partir de l'échantillon analysé avec des rapports de dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ . 100µl de suspension bactérienne sont étalés sur boîte de pétri (généralement milieu LBG + antibiotique) et incubés à 30°C durant 24 heures. Le dénombrement est alors effectué à l'aide de la relation suivante :

$$UFC/mL = \frac{Nb \text{ Colonies} \times 10}{F} \quad F : \text{Facteur de dilution}$$

## 2.6. Cinétique de croissance bactérienne

### 2.6.1. Cinétique de croissance bactérienne en phase liquide (homogène)

Après une pré-culture, les bactéries sont réensemencées dans du milieu frais (Ac 1X + antibiotique), et incubées à 30°C sous agitation (250 rpm).

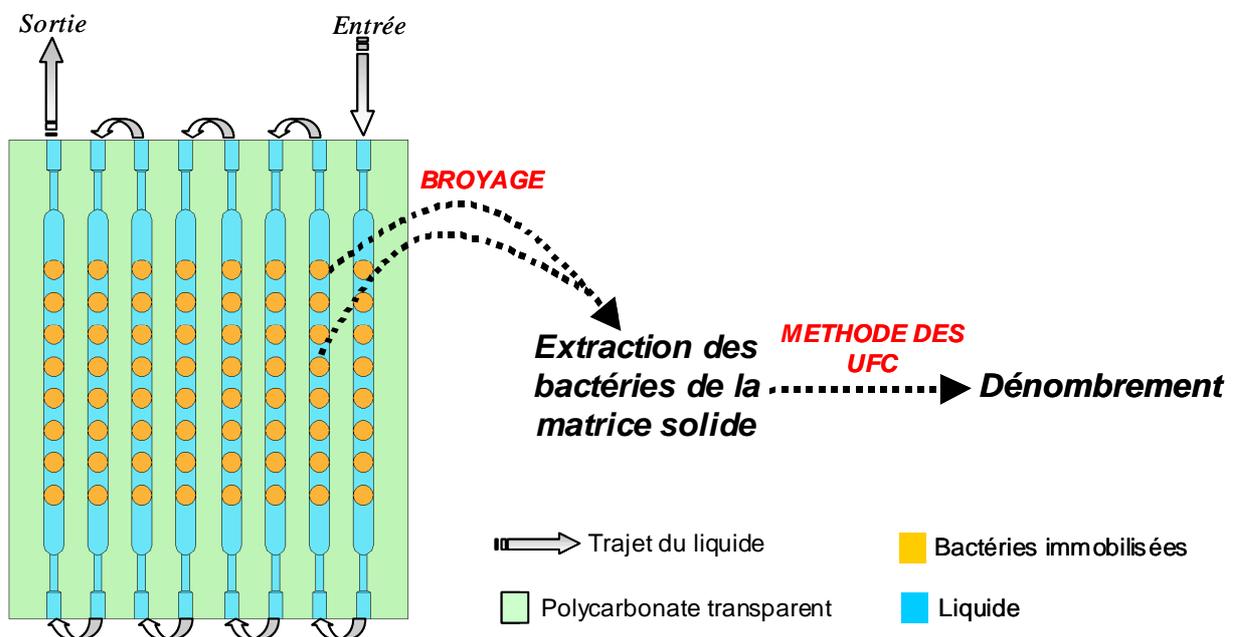
Le suivi de la densité cellulaire dans le milieu de culture est évalué par la mesure de l'absorbance à 620 nm. Un prélèvement est réalisé toutes les 60 minutes environ durant toute la durée de la croissance. La fin du suivi de croissance correspond à l'arrivée des bactéries en phase stationnaire.

### 2.6.2. Cinétique de croissance bactérienne en phase immobilisée (hétérogène)

L'évaluation de la densité bactérienne dans un gel d'agarose nécessite une étape préliminaire (Affi 2009).

En effet, les bactéries étant emprisonnées dans une matrice solide, il est nécessaire de les extraire préalablement. Pour cela, l'hydrogel est retiré du puits à l'aide d'une œuse stérile et introduit dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5ml. Il est ensuite broyé à l'aide d'un piston broyeur stérile (Cyclo-prep ; AMRESCO), repris dans 500µl de solution de MgSO<sub>4</sub> (10<sup>-2</sup>M) et homogénéisé (Vortex) durant 30 secondes. Après l'homogénéisation du mélange, le dénombrement de la suspension est réalisé par la technique des UFC (cf. paragraphe :2.5.1.2.).

Le suivi de croissance en phase immobilisée a été réalisé en utilisant la carte multi-canal de Lumisens III en configuration mono-canal (figure 26). Chaque jour, une ligne a été sacrifiée afin de pouvoir prélever les hydrogels contenant les bactéries sans interrompre l'expérimentation. Le suivi de croissance en phase immobilisée a été réalisé sur une période de 5 jours.



**FIGURE 26 :** PROCEDURE DE DENOMBREMENT DES BACTERIES EN PHASE IMMOBILISEE A PARTIR DE LA CARTE 1 DE LUMISENS III

## 2.7. Transformation des bactéries avec des plasmides

### 2.7.1. Purification des plasmides

Chaque plasmide est extrait et purifié à l'aide d'un kit miniprep (QIAGEN<sup>®</sup>, QIAprep Spin Miniprep Kit) à partir d'une culture bactérienne de la souche hôte dans du milieu de culture LB contenant l'antibiotique approprié. Le protocole suivi est décrit dans le manuel d'utilisation du kit miniprep (QIAprep Miniprep Handbook, Protocol: Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge).

La qualité de l'extraction est vérifiée par migration dans des gels d'agarose à 1% (Eppendorf<sup>®</sup>, tampon TAE 1X) de 10µl de solution plasmidique auxquels sont ajoutés 2µl de tampon de chargement (Eppendorf<sup>®</sup>). Un marqueur de taille est inclus dans chaque gel. La

migration se déroule dans une cuve d'électrophorèse i-mupid dans du tampon de migration TAE 1X à 100 V.

Les gels sont ensuite placés dans un bain de révélation (TAE 1X) contenant du SYBR<sup>®</sup> Safe 1X (Invitrogen<sup>™</sup>) pendant 20 minutes. La lecture des gels se fait sur une table UV.

### 2.7.2. Mise en compétence des bactéries

Seule la souche *E.coli* K12 MG1655 a été mise en compétence afin d'être transformée avec les plasmides souhaités (pBZntlux, pBARslux, pBCoplux et pBMerlux).

Le protocole de mise en compétence des bactéries est issu d'un ouvrage de Sambrook et Russell (2001). Ces bactéries électro-compétentes sont préparées selon la méthode au glycérol. 450ml de culture à une absorbance  $A_{620nm}$  de 0,8 sont centrifugés à 4000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est ensuite lavé une première fois avec 400ml d'eau distillée stérile à 4°C puis 3 autres fois avec, respectivement, 400ml, 200ml et 25ml de glycérol 10% stérile à 4°C en prenant soin de maintenir le culot à 4°C. A chaque lavage, l'étape de centrifugation est réalisée à 4000g durant 10 minutes à 4°C. Le culot final est repris par 400µl de glycérol 10%, aliquoté par 50µl dans des tubes à PCR stériles et stocker à -80°C jusqu'à utilisation.

Les bactéries électro-compétentes conservées à -80°C sont utilisables pendant un an.

### 2.7.3. Transformation des bactéries compétentes

La transformation des bactéries électro-compétentes avec les ADN plasmidiques est réalisé par électroporation comme suit. Dans un premier temps, les cuves à électroporation utilisées (Eppendorf<sup>®</sup>, Référence : 4905021) sont refroidies dans la glace et les fractions aliquotées de cellules compétentes sont décongelées à 4°C. 1µl de solution concentrée d'ADN plasmidique est dilué avec 2µl d'eau distillée stérile (Versol<sup>®</sup>, Eau stérile pour irrigation). Les 3µl de solution plasmidique sont ajoutés au 50µl de suspension de bactéries compétentes (dans la glace) et homogénéiser. Le mélange ADN-cellules de 53µl est transféré dans la cuve à électroporation froide et un choc électrique de 2500 volts est immédiatement exercé avec un électroporateur. Dès le choc électrique terminé, 900µl de milieu LB stérile sont ajoutés afin de remettre les bactéries en suspension et incubés 1h à 37°C. La suspension bactérienne transformée est étalée sur boîte de pétri LBG contenant 100µg.ml<sup>-1</sup> d'ampicilline. Les volumes étalés sont de 1µl, 10µl, 100µl et le culot restant, préalablement concentré (centrifugation durant 4 minutes à 4000g) et incubés durant 24 heures à 37°C.

### 2.7.4. Criblages des clones recombinants

Seules les bactéries transformées avec le plasmide sont capables de se développer sur un milieu contenant de l'antibiotique. En effet, la résistance à l'antibiotique est apportée par le plasmide.

Pour vérifier chaque transformation, plusieurs clones ont été choisis sur boîte de pétri. Ces clones ont été remis en culture et leurs plasmides ont été extraits. Ces solutions plasmidiques

ont été digérés par des enzymes de restrictions et déposé sur gel d'agarose. Les profils de migration ont été comparés aux profils théoriques (obtenus à partir du logiciel pDRAW32, AcaClone). Les clones validés ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  (cf. paragraphe 2.4.4.).

## 2.8. Lyophilisation des bactéries en microplaques

Dans un premier temps, les différentes souches bactériennes inductibles sont remises en culture à  $30^{\circ}\text{C}$  sous une agitation de 250 rpm à  $A_{620\text{nm}} = 0,2$ . Après environ une heure de culture, la souche constitutive est, à son tour, remise en culture à  $30^{\circ}\text{C}$  sous une agitation de 250 rpm à  $A_{620\text{nm}} = 0,075$ . Le décalage entre les deux remises en culture permet d'obtenir en même temps les bactéries à la densité cellulaire souhaitée (souches inductibles :  $A_{620\text{nm}} = 0.45$  et souche constitutive :  $A_{620\text{nm}} = 0.16$ ).

En parallèle, 100ml de solution de saccharose stérile à 24% (cf. paragraphe 2.3.3.2.) et 100ml de milieu acétate (Ac 1x) stérile (cf. paragraphe 2.3.1.) sont refroidis dans la glace.

Lorsque les absorbances souhaitées à 620nm sont atteintes, 7 ml de suspension de bactéries inductibles et 16ml de suspension de bactéries constitutives sont centrifugés dans des tubes Falcon<sup>®</sup> de 50ml à 10000 g pendant 10 minutes et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les culots bactériens sont repris par 5 ml de milieu Ac1x refroidi et 5 ml de saccharose à 24% refroidi. L'absorbance à 620nm est ajustée pour l'ensemble des souches à 0,075 avec 50% de milieu Ac 1x à  $4^{\circ}\text{C}$  et 50% de saccharose à 24% à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Les suspensions diluées de bactéries sont ensuite réparties dans les microplaques (MicroWell<sup>™</sup> plate, Nunc<sup>™</sup>) à hauteur de 100 $\mu\text{l}$  de suspension par puits et placées à  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 2 h 30 environ avant d'être lyophilisées à  $-50^{\circ}\text{C}$  sous une pression de 0,05 mbar durant 36 heures (Christ<sup>®</sup>, Alpha 1-2). Les microplaques lyophilisées sont fermées hermétiquement avec un film autocollant en polyéthylène transparent (Dominique Dutscher, Référence : 106524) et stockées jusqu'à 3 mois à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.9. Essai d'induction en microplaque : bioessai

### 2.9.1. Essai d'induction avec des bactéries en phase liquide

A partir d'une culture de bactérie à la densité souhaitée (cf. paragraphe 2.4.3.), La densité cellulaire des suspensions bactériennes est ajustée à  $A_{620\text{nm}} = 0,075$ . Les différentes suspensions bactériennes diluées sont réparties dans des micro-plaques (MicroWell<sup>™</sup> plate, Nunc<sup>™</sup>) à hauteur de 100 $\mu\text{l}$  par puits. 25 $\mu\text{l}$  de solution à tester sont introduits par puits (dilution 1/5 de la solution testée). Le suivi de la production de bioluminescence est réalisé à l'aide d'un luminomètre à microplaque (Berthold<sup>®</sup> MicroLumat Plus Lb96V). Les paramètres de mesure sont :

- temps d'intégration : 1 seconde par puits
- consigne de température imposée à l'élément pelletier :  $30^{\circ}\text{C}$

Une mesure est effectuée après 0 et 60 minutes de contact bactéries/échantillon et entre chaque point de mesure, les bactéries sont incubées à  $30^{\circ}\text{C}$ .

### 2.9.2. Essai d'induction avec des bactéries lyophilisées

Dans le cas de bactéries lyophilisées, une étape préalable de réhydratation est nécessaire. 100µl d'eau distillée sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque contenant de bactéries. Cette dernière est ensuite incubée à 30°C pendant 30 minutes. 25µl de solution à tester sont introduits par puits. Le suivi de la bioluminescence est réalisé dans les mêmes conditions que pour les essais d'induction avec des bactéries en phase liquide.

### 2.9.3. Traitement des données brutes de bioluminescence

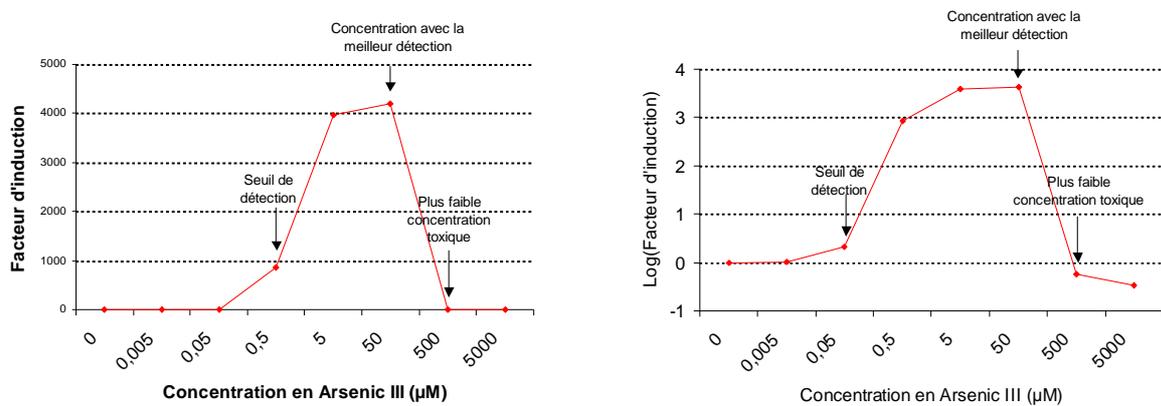
Les données brutes de bioluminescence sont converties en facteur d'induction ou en taux d'inhibition en fonction des souches bactériennes utilisées.

Avec les souches bactériennes inductibles, les données sont converties en facteur d'induction selon la formule suivante :

$$FI = \frac{(BL_{mesurée})}{(BL_{témoin})}$$

FI : Facteur d'induction  
 BL<sub>mesurée</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec l'échantillon testé (RLU.s<sup>-1</sup>)  
 BL<sub>témoin</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec le témoin (eau distillée) (RLU.s<sup>-1</sup>)

Dans certains cas, les facteurs d'induction sont transformés en logarithme afin de réduire les distances arithmétiques entre certaines valeurs et ainsi amplifier des différences (Figure 27).



**FIGURE 27 :** MISE EN EVIDENCE DES DIFFERENCES PAR CONVERSION DES FACTEURS D'INDUCTION EN LOGARITHME. (SOUCHE *E. COLI* K12 MG1655 pBARSLUX)

On note que le passage du facteur d'induction vers son logarithme permet de mettre en évidence des différences. Ainsi le seuil de détection s'abaisse dans cet exemple de 0,5µM à 0,05µM.

Avec la souche bactérienne constitutive, les données de bioluminescence sont converties en taux d'inhibition selon l'équation suivante :

$$TI = 1 - \frac{(BL_{mesurée})}{(BL_{témoin})}$$

TI : Taux d'inhibition d'induction  
 BL<sub>mesurée</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec l'échantillon testé (RLU.s<sup>-1</sup>)  
 BL<sub>témoin</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec le témoin (eau distillée) (RLU.s<sup>-1</sup>).

## **2.10. Analyse descriptive des données collectées et développement des arbres de décisions**

### **2.10.1. Construction d'une matrice de données : plan d'expérience**

Conventionnellement, l'étude des phénomènes biologiques implique une prise en considération de l'ensemble des facteurs indépendamment afin de montrer leurs principaux effets. Avec cette approche, le nombre d'essais à réaliser augmente considérablement avec le nombre de paramètres étudiés (quatre métaux) et le nombre de niveaux attribués à chacun de ces paramètres (quatre niveaux de concentration). Ainsi, dans notre cas, le nombre de conditions expérimentales s'élève à  $4^4$  soit 256 conditions à réaliser. A noter, que cette approche facteur par facteur ne permet pas d'appréhender les phénomènes d'interactions entre les paramètres évalués.

Les plans d'expériences sont des outils totalement appropriés dans le cadre de l'évaluation d'un grand nombre de variables simultanément, tout en incluant les phénomènes d'interaction. Avec cette approche, contrairement à l'approche facteur par facteur, l'ensemble des niveaux de chacun des facteurs sont définis préalablement selon un schéma d'étude avec l'objectif de visualiser le mieux possible d'une part, les effets propres aux facteurs étudiés (bioluminescence induite en fonction des métaux exposés) et d'autre part, les phénomènes d'interaction entre les facteurs (conséquence de mélange de métaux sur l'induction de la bioluminescence bactérienne). Cette étape du projet, réalisé en collaboration avec *P.Courcoux* de l'ONIRIS (Nantes) a permis de réduire le nombre de conditions à réaliser de 256 à 192 conditions.

Le plan d'expérience a ainsi permis, d'une part, de réduire considérablement le nombre d'expériences à réaliser mais également d'obtenir une matrice de données représentant au mieux les relations entre métaux testés en mélange et réponses bactériennes induites.

A noter que les niveaux de chaque facteur ont été choisis en fonction des sensibilités des souches bactériennes de références. Les concentrations ont été choisies pour représenter des gammes de concentrations. Les concentrations ont été déterminées à partir des résultats issus lors de la première phase de l'étude concernant la caractérisation des souches bactériennes bioluminescentes.

### **2.10.2. Analyses descriptives : Analyses factorielles discriminantes**

Une première étape d'analyse descriptive des données a été réalisée afin d'évaluer rapidement la répartition des données de bioluminescence bactérienne en fonction des métaux et de leurs niveaux respectifs. Une analyse factorielle discriminante, procédure statistique incluse dans le logiciel XLSTAT (Addinsoft™) a été appliquée à l'ensemble des données collectées. Ainsi, des données inexploitables (données issues d'échantillon toxique) ont été écartées de la matrice totale et des groupements de différentes concentrations ont été réalisées (concentrations induisant des niveaux de bioluminescence similaires).

### 2.10.3. Développement des arbres de décisions

Dans le cadre du projet d'identification de métaux par bactéries bioluminescentes, des outils statistiques tels que les arbres de décision sont utilisés non pas comme outil d'analyse exploratoire des données mais en tant qu'outil de prédiction. Aussi, l'étape de conception des arbres de décision est une étape primordiale composée de deux phases.

Une phase d'apprentissage, réalisée à partir d'un jeu de données dit « d'apprentissage », au cours de laquelle sont développés les arbres de décisions. L'objectif de cette phase est de répartir les données en groupes homogènes selon des critères de segmentation calculés à partir de différentes variables prises en compte dans les modèles (bioluminescence des différentes souches bactériennes).

La seconde phase, dite « d'évaluation », est réalisée à partir d'un autre jeu de données : le jeu d'évaluation. Elle permet d'évaluer l'efficacité prédictive des différents modèles.

Le développement de ces arbres a été réalisé par l'intermédiaire de deux logiciels d'induction d'arbre de décision :

- le logiciel SIPINA, développé par l'Equipe de Recherche en Ingénierie des Connaissances (ERIC) de l'Université Lumière Lyon 2 (Zighed *et al.* 1992).
- le logiciel Metalsoft, développé au sein du laboratoire, dédié spécifiquement à notre projet.

#### 2.10.3.1. Répartition aléatoire des données : jeu d'apprentissage et jeu d'évaluation.

L'ensemble des données prétraitées (données totales moins les données non exploitables issues de l'analyse factorielle discriminante) obtenues par le plan d'expérience a été réparti aléatoirement en deux groupes, un jeu d'apprentissage et un jeu d'évaluation, avec un taux de répartition respectif de 70% et de 30%. Cette étape est induite par une fonction de répartition aléatoire interne aux logiciels d'induction utilisés.

#### 2.10.3.2. Logiciel SIPINA

SIPINA est un outil gratuit d'exploration de données spécialisé dans l'induction d'arbres de décision. C'est un logiciel libre d'accès (<http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/sipina.html>) intégrant des fonctionnalités interactives lors de la construction d'arbres de décision.

L'algorithme utilisé pour la création des arbres est de type Improved CHAID (CHi-Squared Automatic Interaction Detector) : variante de l'algorithme originel CHAID, (Kass 1980). Avec cet algorithme, les variables de segmentation et de leurs valeurs sont calculés à partir du test t de Tschuprow (Rakotomalala 2005), équivalent normalisé par le nombre de degrés de libertés du  $\text{Khi}^2$  dont le domaine de définition est  $[0 ; 1]$ . Au cours de cette phase préliminaire, aucun critère automatique d'élagage (pré-élagage ou post-élagage) n'a été mis en œuvre. Les arbres ont été élaborés à partir du jeu d'apprentissage (cf. paragraphe 2.10.3.1.)

Les arbres obtenus ont été appliqués sur le jeu de données d'évaluation et optimisés manuellement par post-élagage afin de réduire le taux d'erreur d'identification.

### 2.10.3.3. Logiciel Metalsoft développé dans le cadre du projet

Cet outil informatique, développé en langage JAVA, vise d'une part à assister l'opérateur lors de la phase de conception des modèles prédictifs par arbre de décision et d'autre part à faciliter l'interprétation des données issues d'échantillons inconnus.

Le module de conception des arbres de décision repose sur le même algorithme que précédemment (2.10.3.2. Logiciel SIPINA) : Improved CHAID. Pour concevoir les arbres de décision, les données prétraitées ont été réparties aléatoirement en 2 groupes : un jeu d'apprentissage permettant la création des arbres et un jeu d'évaluation utilisés dans le but d'estimer leurs performances discriminatoires (taux d'erreur). Cependant, la qualité et l'aspect des arbres sont fortement influencés par les données incluses dans ce jeu d'apprentissage. Aussi, pour améliorer le pouvoir discriminant des arbres générés, une fonction optionnelle a été intégrée dans ce module. Cette fonction consiste à générer une multitude d'arbres de décision unique (dans notre cas :  $n=1000$ ) basés, à chaque fois, sur une nouvelle répartition des données entre le jeu d'apprentissage et le jeu d'évaluation tout en conservant le ratio de distribution, respectivement 70% et 30%. Cette fonction permet ainsi de limiter l'effet des données aberrantes incluses dans le jeu d'apprentissage. Afin de limiter l'expansion des arbres, et parallèlement l'obtention d'un modèle surdimensionné non représentatif des phénomènes observés, un critère de pré-élagage a été instauré : effectif minimal d'un nœud = 4.

Le second module d'aide à l'interprétation des données est un outil graphique qui facilite l'analyse des données de bioluminescence bactérienne obtenues à partir d'échantillon inconnu. Il permet d'estimer la concentration présente en métal dans l'échantillon analysé (ici, cadmium, arsenic, mercure et cuivre).

### **2.10.4. Validation des arbres de décision sur des échantillons de l'environnement.**

Afin de valider les modèles prédictifs par arbre de décision, ces derniers ont été soumis à des échantillons industriels ou environnementaux potentiellement contaminés par des métaux. Ainsi l'évaluation du pouvoir discriminant du modèle a été réalisée par comparaison entre, d'un côté, les concentrations prédites avec notre méthode biologique associant bactéries bioluminescentes et arbres de décision, et de l'autre côté, les concentrations mesurées par les méthodes chimiques traditionnelles.

### **2.11. Ingénierie du biocapteur hybride : bioessai en continu**

Lumisens IV est un système de suivi en ligne des polluants par bactéries bioluminescentes lyophilisées développé au cours de cette thèse. Nous ne traiterons pas ici de l'aspect technique de l'appareil car il sera développé très largement ultérieurement dans le chapitre 6.

## **RESULTATS**

---

### **Chapitre 3 : Caractérisation des souches bactériennes et mise au point de la méthode de détection de métaux lourds**

---

A l'exception de la souche constitutive *E.coli* DH1 pBTaflux (contrôle de toxicité), l'ensemble des souches bactériennes utilisées au cours de cette thèse sont issues de la transformation de la souche *E.coli* K12 MG1655 avec différents plasmides de détection des métaux.

### 3.1. Construction des souches bactériennes inductibles bioluminescentes

Les plasmides utilisés ont été développés soit au cours de travaux antérieurs (Charrier 2006, Charrier *et al.* 2010b) soit dans le cadre de ces travaux (cas du plasmide pBMerlux). Le schéma général des plasmides reste le même quelle que soit la construction : l'opéron de bioluminescence de *Vibrio fischeri*, *luxCDABE*, est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible (*parsR*, *pcopA*, *pzntA* ou *pmerT*) ; un gène de résistance (*ampR*) est cloné dans le vecteur afin de faciliter le maintien des constructions dans les cellules. Certaines constructions intègrent également des gènes de régulation des promoteurs (*ArsR* ou *MerR*). Les cartes des plasmides sont reprises dans la figure suivante.

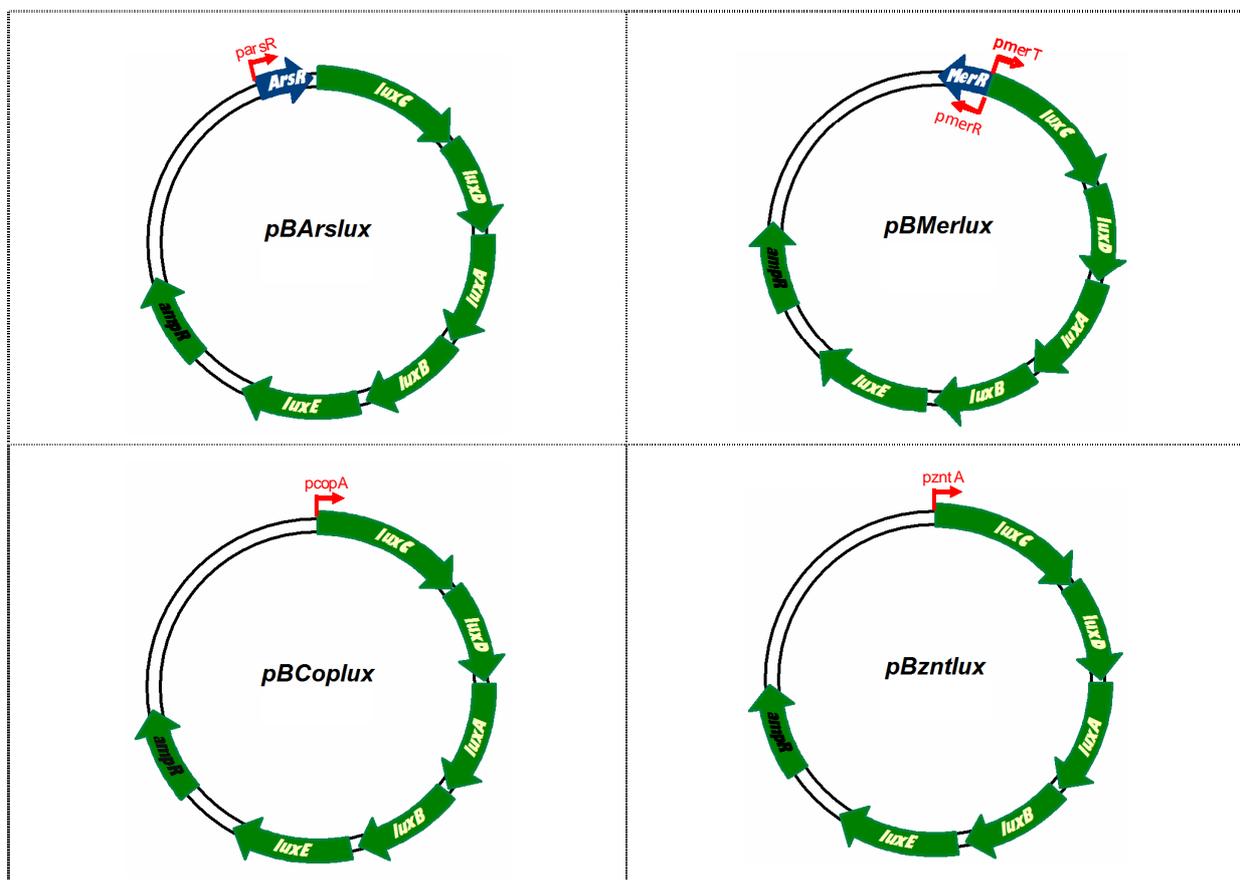


FIGURE 28 : PLASMIDES UTILISES POUR LA DETECTION DE METAUX SPECIFIQUES DANS LE CADRE DE CETTE THESE.

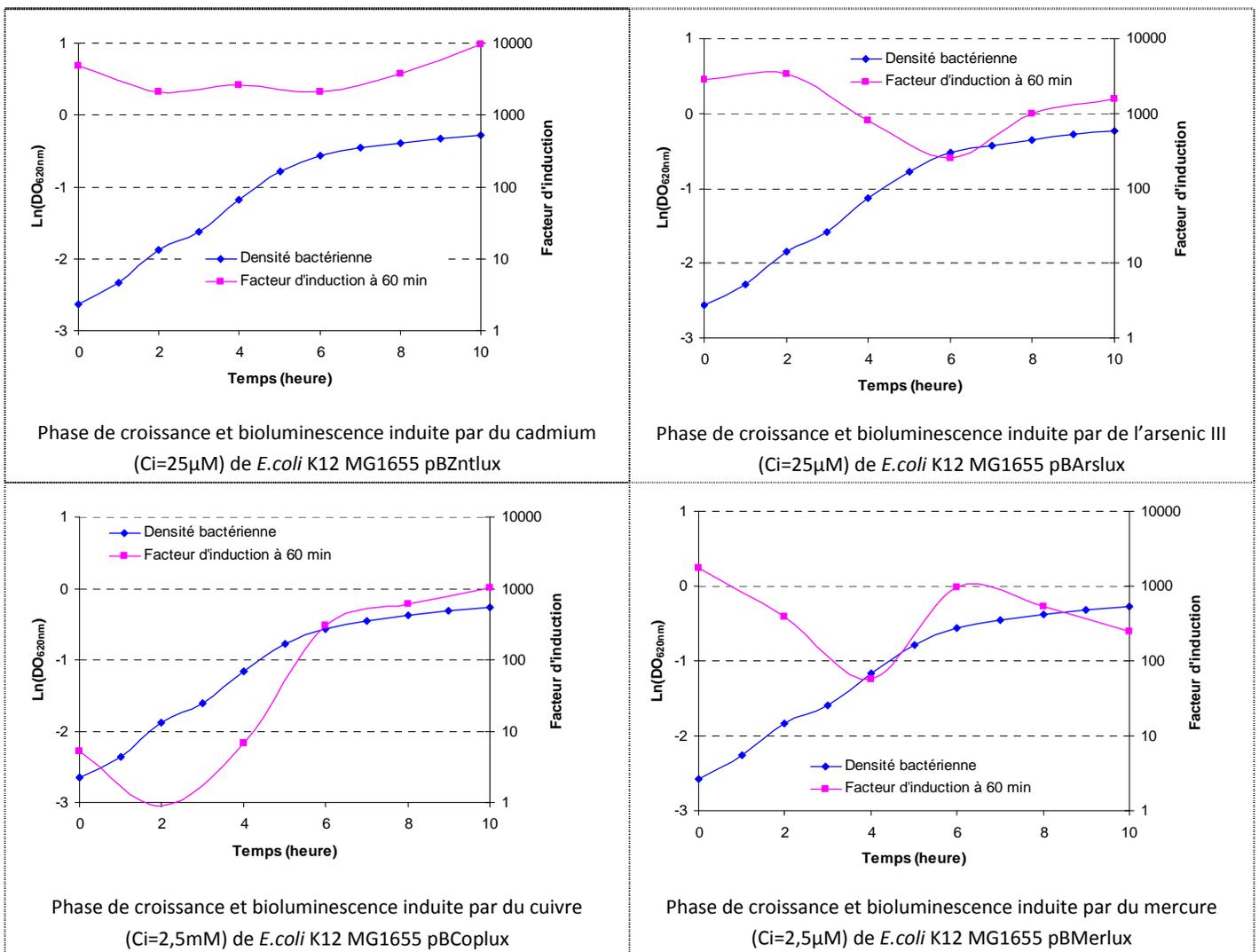
### 3.2. Effet de la phase de croissance sur l'induction de la bioluminescence des souches bactériennes

Comme décrit précédemment (1.3.4. Paramètres influençant la bioluminescence bactérienne), l'état physiologique des bactéries est un paramètre qui influe fortement sur les niveaux de

production de bioluminescence. Ainsi de mieux appréhender ce phénomène, la production de bioluminescence induite a été suivie en parallèle de la croissance des bactéries.

### 3.2.1. Effet de la phase de croissance sur les souches bactériennes inducibles

L'étude réalisé sur les souches bactériennes inducibles a consisté à mesurer les niveaux de bioluminescence produits après 60 minutes d'exposition au métal. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 29. Les courbes en bleu représentent la croissance des bactéries et les courbes en rose montrent les niveaux de bioluminescence produits par les bactéries inducibles.



**FIGURE 29 :** EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR LA DETECTION DES SOUCHES *E.COLI* K12 MG1655 PBZNTLUX, PBARSLUX, PBCOPLUX ET PBMERLUX (N=2).

Conditions expérimentales : Culture en batch, milieu Ac 1X, 30°C, 250rpm. Absorbance mesurée à 620nm. Induction réalisée en microplaque, 25μl d'une solution cinq fois concentrée en métal sont ajoutés à 100μl de suspension bactérienne à DO<sub>620nm</sub>=0,075. La mesure est réalisée après 60 minutes d'incubation à 30°C.

Ci : Concentration initiale avant dilution par 5 dans les puits

Les taux de croissance observés pour les différentes souches bactériennes étudiées ne sont pas influencés par les constructions plasmidiques. En effet, les taux de croissance respectifs pour *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, pBArlux, pBCoplux et pBMerlux sont de  $0,534h^{-1}$ ,  $0,522h^{-1}$ ,  $0,543h^{-1}$  et  $0,515h^{-1}$ .

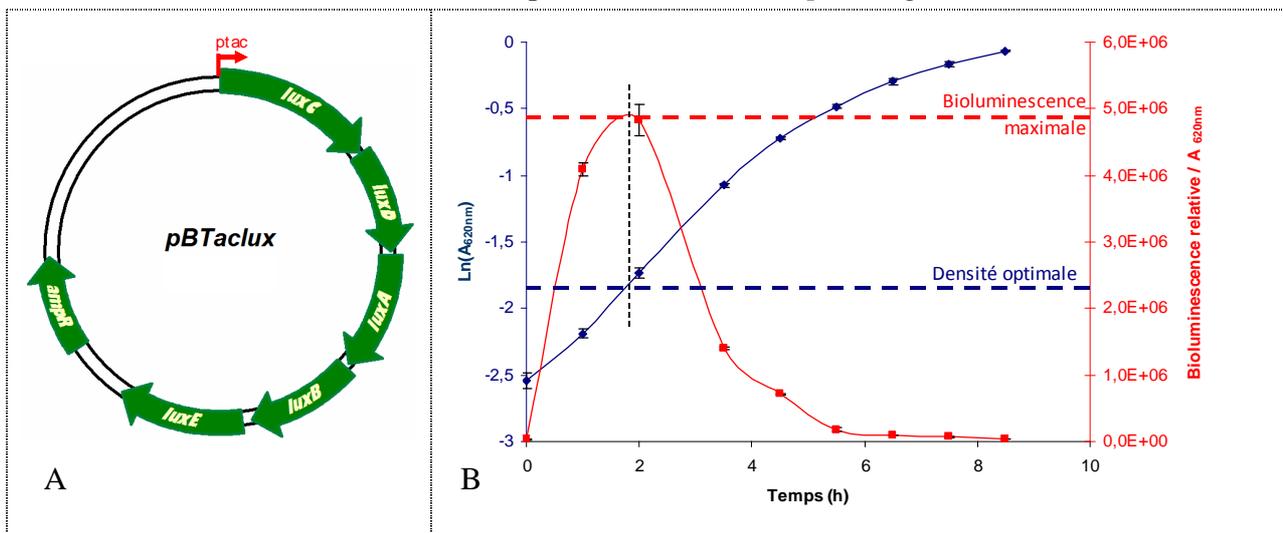
D'après ces résultats, la phase de croissance a un rôle plus ou moins important dans l'induction de la bioluminescence en fonction des souches bactériennes inductibles. Avec les souches *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, pBArlux et pBMerlux, les niveaux de bioluminescence induits restent relativement stables malgré les différentes phases de croissance bactérienne, mis à part la baisse observée en fin de phase exponentielle pour *E.coli* K12 MG1655 pBArlux et pBMerlux.

Avec la souche *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux, la production de bioluminescence dépend d'avantage de la phase de croissance. En effet, les niveaux observés en phase exponentielle sont significativement plus faible qu'en phase stationnaire : les facteurs d'induction calculés en phase exponentielle sont inférieurs à 10 alors qu'en phase stationnaire, ils dépassent 200.

Ces premiers résultats mettent en évidence l'importance de la maîtrise des conditions de cultures des bactéries. En effet, il est primordiale de contrôler la croissance bactérienne de manière à obtenir des données reproductibles.

### 3.2.2. Effet de la phase sur la souche bactérienne constitutive (*E.coli* DH1 pBTAclux)

Une étude similaire a été réalisée avec la souche bioluminescente constitutive. Cette souche, *E.coli* DH1 pBTAclux, a été transformée avec un vecteur plasmidique contenant l'opéron de bioluminescence sous le contrôle du promoteur constitutif *ptac* (figure 30-A).



**FIGURE 30 :** CONSTRUCTION PLASMIDIQUE PBTACLUX ET EFFET DE LA PHASE DE CROISSANCE SUR LA PRODUCTION DE BIOLUMINESCENCE DE LA SOUCHE *E. COLI* DH1 PBTACLUX.

Conditions expérimentales : Culture en batch, milieu Ac 1X, 30°C, 250rpm. Absorbance mesurée à 620nm. Suivi de bioluminescence en microplaque, 100µl de suspension bactérienne. Les données de bioluminescence obtenues sont rapportées à l'absorbance à 620nm ( $BL_{mesurée} / A_{620nm}$ ).

En parallèle du suivi de la croissance bactérienne (Figure 30-B), la bioluminescence émise a été mesurée. La courbe en bleu représente la croissance des bactéries et la courbe rouge, la bioluminescence produite.

On note un taux de croissance horaire avec cette souche de  $0,597^{h^{-1}}$ . Ces résultats mettent en évidence un pic d'émission de bioluminescence en début de phase exponentielle à  $A_{620nm}=0,18$ . Le promoteur *ptac* étant un promoteur hybride fonctionnel dérivé des promoteurs *trp* et *lac* (De Boer *et al.* 1983), il a conservé le site de régulation par la protéine LacI du promoteur *lac*. *ptac* est donc directement régulé par LacI (Cookson *et al.* 1990). LacI est une protéine naturellement synthétisée chez *E.coli* DH1, toutefois, les concentrations présentes dans les cellules bactériennes peuvent varier en fonction des phases de croissance (Michan *et al.* 1999) expliquant ainsi l'évolution observée des niveaux d'émission de la bioluminescence.

### 3.3. Spécificités des souches inductibles

Comme le démontre la littérature, les constructions génétiques mises en oeuvre pour la détection des métaux ne permettent pas une reconnaissance mono-spécifique de composés chimiques. En effet, une souche bactérienne bioluminescente inductible est généralement sensible à plusieurs métaux (Binet and Poole 2000, Riether *et al.* 2001, Stoyanov and Brown 2003, Ivask *et al.* 2009, Charrier *et al.* 2010b). Inversement un même métal peut induire une réponse chez différentes souches bactériennes malgré des différences entre les constructions génétiques : promoteurs inductibles (Moore *et al.* 2005, Wang and Crowley 2005, Ivask *et al.* 2009, Charrier *et al.* 2010b).

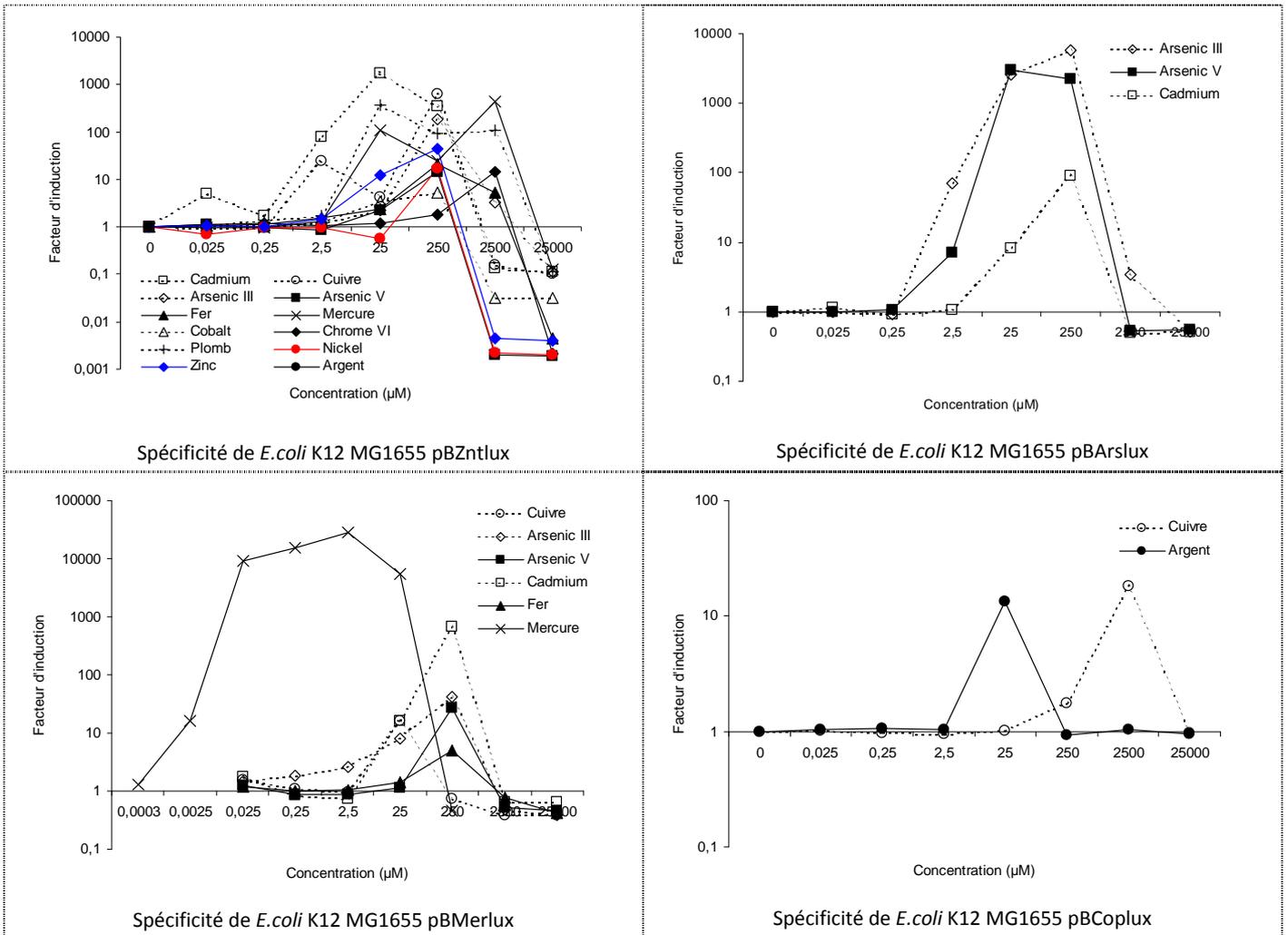
**TABLEAU 18 :** METAUX TESTES ET LIMITES DE DETECTION OBSERVEES AVEC LES SOUCHES BACTERIENNES BIOLUMINESCENTES INDUCTIBLES.

Métaux testés	Limite de détection ( <i>Ecart type</i> ) (µM)				Seuils légaux* (µM)
	Zntlux	Arslux	Merlux	Coplux	
Cadmium	0,02 (0,018)	4,7 (1,8)	4,8 (1,9)	Nd	0,045
Mercure	0,053 (0,007)	Nd	0,0018 (0,00003)	Nd	0,005
Arsenic III	21 (14,7)	0,725 (0,17)	1,6 (1,12)	Nd	0,135
Cuivre	33,1 (16,5)	Nd	5,3 (0,91)	309,3 (32,5)	31,5
Plomb	11,1 (4,5)	Nd	Nd	Nd	0,05
Etain	Nd	Nd	Nd	Nd	Nc
Arsenic V	15,7 (2,8)	0,82 (0,0004)	33,7 (0,8)	Nd	0,135
Zinc	13,75 (0)	Nd	Nd	Nd	Nc
Nickel	137,5 (0)	Nd	Nd	Nd	0,34
Cobalt	14,1 (3,1)	Nd	Nd	Nd	Nc
Chrome VI	969,5 (142,1)	Nd	Nd	Nd	1
Chrome III	Nd	Nd	Nd	Nd	1
Argent	Nd	Nd	Nd	6,7 (0,08)	Nc
Fer	18,9 (7,2)	Nd	65,4 (23,4)	Nd	3,5 <sup>a</sup>
Manganèse	Nd	Nd	Nd	Nd	1

Zntlux : *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux ; Arslux : *E.coli* K12 MG1655 pBArslux ; Merlux : *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux ; Coplux : *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux ; Nd : Non détecté ; Nc : Non concerné par la législation ; \* : réglementation européenne appliquée aux eaux de consommation humaine (98/83/CE).<sup>a</sup> : Paramètre indicateur

Afin de déterminer les gammes de détection des quatre souches bactériennes inductibles, quinze métaux ont été testés en bioessai (Tableau 18). Les limites de détection observés avec les souches bactériennes sont reprises dans le tableau 18.

Néanmoins, il est important de préciser que les niveaux d'induction dépendent du composé analysé ainsi que de sa concentration. La figure 31 représente les facteurs d'induction observés en fonction des métaux et de leurs concentrations après 60 minutes d'exposition entre bactéries et métal analysé.



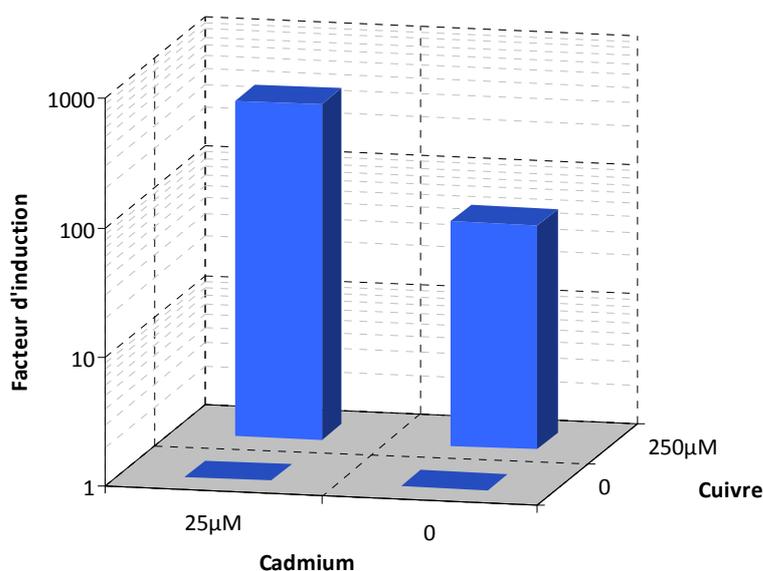
**FIGURE 31 :** MÉTAUX DETECTES ET CONCENTRATIONS INDUISANT *E. COLI* K12 MG1655 PBZNTLUX, PBARSUX, PBMERLUX, ET PBCOPLUX.

Conditions expérimentales : Culture de bactérie à  $A_{620nm}=0,45$  en milieu Ac 1X, 30°C, 250rpm. Dilution de la suspension jusqu'à  $A_{620nm}=0,075$ . Mesure de bioluminescence en microplaque, 100 $\mu$ l de suspension bactérienne et 25 $\mu$ l de solution de métal cinq fois concentrée. La mesure est réalisée après 60 minutes d'incubation à 30°C.

*E. coli* K12 MG1655 pBARslux est susceptible de détecter la présence dans un échantillon d'arsenic III, d'arsenic V ou de cadmium. Toutefois, la production maximale de bioluminescence induite par le cadmium est 10 à 100 fois moins importante qu'en présence d'arsenic III ou d'arsenic V. De façon similaire, l'émission maximale de bioluminescence générée par la souche *E. coli* K12 MG1655 pBMerlux en présence de mercure (Hg) est 100 à 10000 fois supérieure qu'avec les autres métaux détectés.

### 3.4. Phénomène d'interaction

Un autre phénomène peut intervenir lors de la détection de composés dans l'environnement : les phénomènes d'interaction entre les différents éléments présents. En effet, au cours de ces travaux, un cas particulièrement important de synergisme entre le cuivre et le cadmium a été mis en évidence avec la souche *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux. Le graphique suivant (Figure 32) illustre ce phénomène.



**FIGURE 32 :** PHENOMENE D'INTERACTION OBSERVE ENTRE LE CADMIUM (25µM) ET LE CUIVRE (250µM) AVEC *E.COLI* K12 MG1655 pBCOPLUX

Conditions expérimentales : Bactéries lyophilisées en microplaques à  $A_{620nm}=0,075$ . Réhydratation par 100µl d'eau distillée à 30°C durant 30 minutes. Ajout de 25µl de solutions métalliques cinq fois concentrées, la mesure de bioluminescence est réalisée après 60 minutes d'incubation à 30°C.

Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations initialement présentes dans l'échantillon avant dilution par 5.

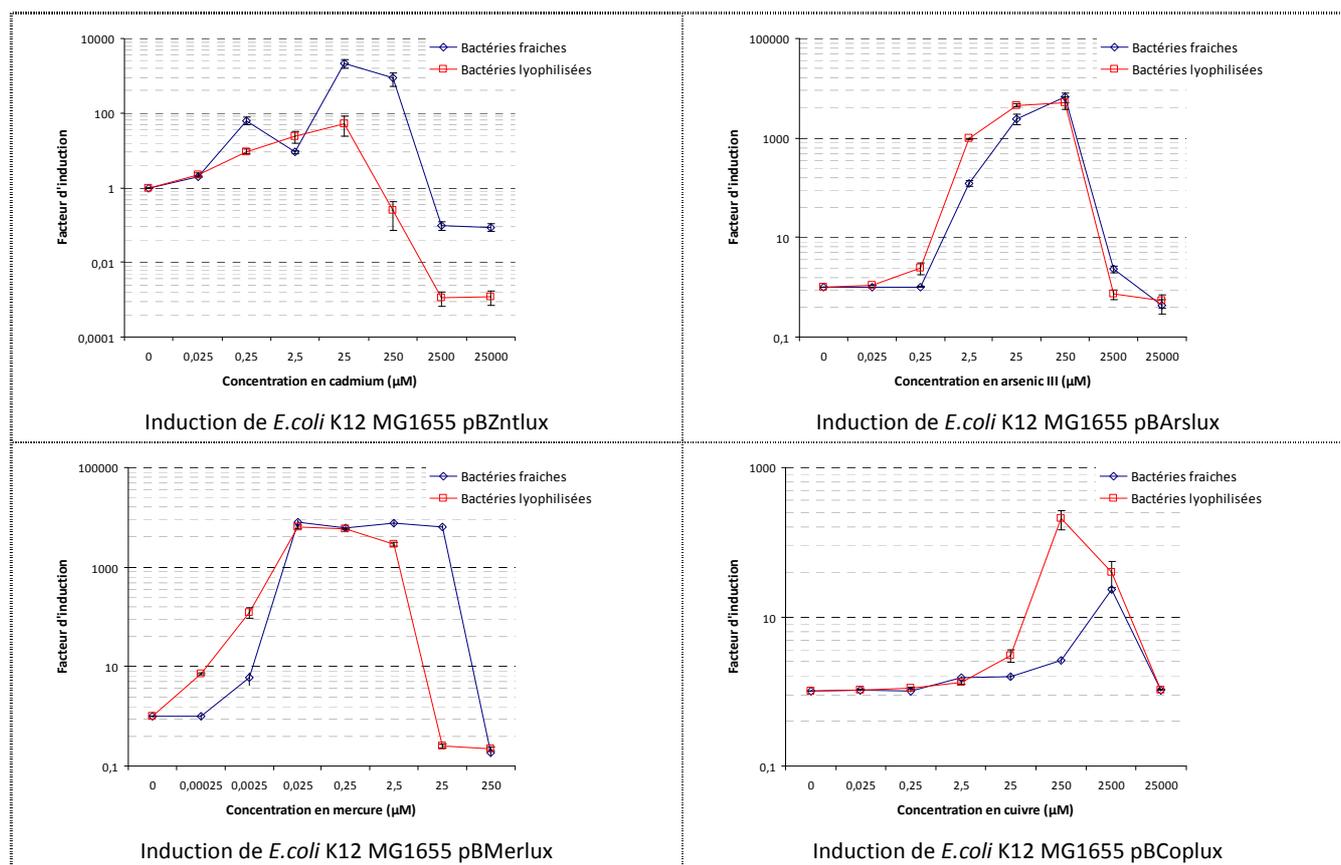
D'après ces résultats, le cadmium seul à la concentration de 25µM n'induit pas de bioluminescence significative de la souche *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux. Le cuivre seul à la concentration de 250µM génère des facteurs d'induction de l'ordre de 50. En mélange, le cadmium et le cuivre induisent un signal de bioluminescence environ 10 fois supérieur au niveau observé avec le cuivre seul. Par conséquent, le cadmium joue un rôle important mais difficilement prévisible dans la détection du cuivre par *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux.

### 3.5. Effet de la lyophilisation sur la détection des métaux.

Dans le cadre de l'étude, la lyophilisation des bactéries a été envisagée pour des raisons de simplicité et de gain de temps. En effet, le protocole de lyophilisation est une méthode relativement simple à mettre en oeuvre (2.8. Lyophilisation des bactéries en microplaques) permettant de réaliser jusqu'à 8 microplaques simultanément soit 64 analyses potentielles contre seulement 8 analyses avec des bactéries fraîches.

#### 3.5.1. Bactéries fraîches versus bactéries lyophilisées

Afin de valider l'utilisation de bactéries lyophilisées pour la détection de métaux, une étape préalable a été mise en place afin d'évaluer l'effet de ce procédé. Les résultats comparatifs obtenus sont présentés dans la figure 33.



**FIGURE 33 :** INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION SUR LA DETECTION DU CADMIUM, DE L'ARSENIC III, DU MERCURE ET DU CUIVRE, RESPECTIVEMENT, PAR *E. COLI* K12 MG1655 pBZNTLUX, pBARSLUX, pBMERLUX ET pBCOPLUX.

Conditions expérimentales : 100µl de bactéries fraîches ou lyophilisées en microplaques à  $A_{620nm}=0,075$ . Ajout de 25µl de solutions métalliques cinq fois concentrées, la mesure de bioluminescence est réalisée après 60 minutes d'incubation à 30°C.

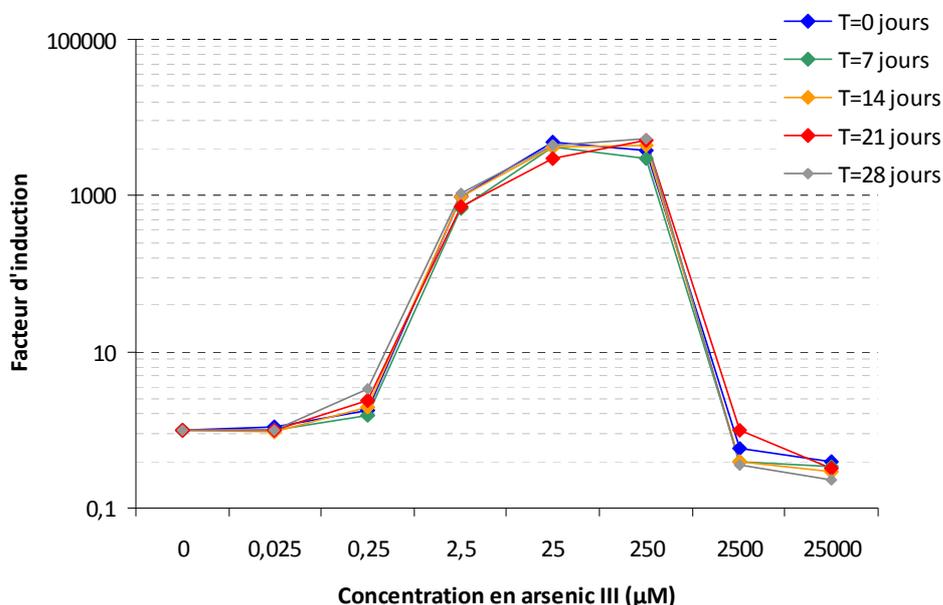
Dans l'ensemble, les résultats montrent un abaissement des limites de détection et augmentation de la sensibilité à la toxicité. Les seuils de détection de *E. coli* K12 MG1655 pBArslux, pBMerlux et pBCoplux passent respectivement de 2,5µM à 250nM, de 2,5nM à 250pM et de 250µM à 25µM. Avec *E. coli* K12 MG1655 pBZntlux, la limite de détection semble rester la même que les bactéries soient lyophilisées ou non.

En outre, les facteurs d'induction observés avec les bactéries fraîches et les bactéries lyophilisées sont sensiblement similaires à l'exception d'*E. coli* K12 MG1655 pBZntlux. Dans ce cas, la diminution des facteurs d'induction est liée non pas d'une baisse d'émission de la bioluminescence induite mais d'une augmentation du niveau de base de la bioluminescence des bactéries (en absence d'inducteur).

### 3.5.2. Effet de la conservation des bactéries lyophilisées sur la détection des métaux

Tout l'intérêt de la lyophilisation réside dans la conservation des souches à -20°C. En effet, cette étape supplémentaire devait permettre un gain de temps significatif par rapport aux bactéries fraîches en bioessai. Aussi, pour valider cette hypothèse, les niveaux d'induction de

l'ensemble des souches bactériennes ont été mesurés durant une période d'un mois et comparés afin d'évaluer les variations induites par la conservation. Etant donnée la similarité des résultats d'une souche à l'autre, seuls sont présentés, sur la figure 34, les résultats obtenus avec *E.coli* K12 MG1655 pBARslux.



**FIGURE 34 :** EFFET DU STOCKAGE A  $-20^{\circ}\text{C}$  DES BACTERIES LYOPHILISEES SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE CHEZ *E. COLI* K12 MG1655 pBARSLUX.

Conditions expérimentales : Bactéries lyophilisées en microplaques à  $A_{620\text{nm}}=0,075$ . Réhydratation par 100µl d'eau distillée à  $30^{\circ}\text{C}$  durant 30 minutes. Ajout de 25µl de solutions métalliques cinq fois concentrée, la mesure de bioluminescence est réalisée après 60 minutes d'incubation à  $30^{\circ}\text{C}$ .

Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations initialement présentes dans l'échantillon avant dilution par 5.

D'après ces données, la conservation n'a pas d'effet significatif sur la détection des métaux. En effet, les analyses effectuées après 28 jours de conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  sont identiques tant au niveau de la sensibilité qu'au niveau des facteurs d'induction.

### 3.5.3. Etude de la sensibilité et de la spécificité des souches bactériennes sous forme lyophilisées .

Au vu des différences de sensibilités observées entre les bactéries fraîches et les bactéries lyophilisées, il était important de vérifier les spécificités de ces souches inductibles. Les résultats (Tableau 19) montre en effet quelques différences de spécificité avec les données obtenues précédemment (tableau 18) principalement associé avec les métaux « satellites » autrement dit les métaux n'étant pas les cibles privilégiées des promoteurs inductibles. Le cuivre n'est plus détecté par la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux sous forme lyophilisée. Au contraire, l'étain, le plomb et le zinc intègrent les listes des composés détectés par les souches inductibles lyophilisées, respectivement, *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, pBARslux et pBMerlux.

**TABLEAU 19 :** MÉTAUX TESTÉS ET LIMITES DE DÉTECTION OBSERVÉES AVEC LES SOUCHES BACTÉRIENNES INDUCTIBLES SOUS FORME LYOPHYLISÉES.

Métaux testés	Limite de détection ( <i>Ecart type</i> ) (µM)				Seuils légaux (µM)
	Zntlux	Arslux	Merlux	Coplux	
Cadmium	0,0045 (0,0003)	5,9 (2,3)	0,011 (0,002)	Nd	0,045
Mercure	0,01 (0,005)	Nd	1,7.10-7 (1.10-7)	Nd	0,005
Arsenic III	28,52 (7,1)	0,256 (0,0014)	15,6 (4,3)	Nd	0,135
Cuivre	16,92 (2,9)	Nd	Nd	90,5 (11,7)	31,5
Plomb	2,2 (0,6)	4,16 (0,8)	Nd	Nd	0,05
Etain	12,95 (4,24)	Nd	Nd	Nd	Nc
Arsenic V	9,32 (1,24)	0,3 (0,06)	12,65 (5,4)	Nd	0,135
Zinc	1,7 (0,62)	Nd	2,3 (0,14)	Nd	Nc
Nickel	4,4 (1,6)	Nd	Nd	Nd	0,34
Cobalt	0,22 (0,014)	Nd	Nd	Nd	Nc
Chrome VI	597,2 (121,3)	Nd	Nd	Nd	1
Chrome III	Nd	Nd	Nd	Nd	1
Argent	Nd	Nd	Nd	2,75 (0,11)	Nc
Fer	4,34 (0,48)	Nd	16,1 (7,6)	Nd	3,5 <sup>a</sup>
Manganèse	Nd	Nd	Nd	Nd	1

Zntlux : *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux ; Arslux : *E.coli* K12 MG1655 pBArslux ; Merlux : *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux ; Coplux : *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux ; Nd : Non détecté ; Nc : Non concerné par la législation. En rouge : différence de spécificité avec les bactéries fraîches ; \* : réglementation européenne appliquée aux eaux de consommation humaine (98/83/CE) ; <sup>a</sup> : Paramètre indicateur.

### 3.6. Conclusion

Cette première phase de l'étude a permis de comprendre un certain nombre de points. Tout d'abord, l'étude a montré un certain nombre d'avantages apportés par la lyophilisation des bactéries bioluminescentes. Cette étape supplémentaire lors de la réalisation des bioessais permet un gain de temps significatif et également la conservation des souches en bioessai (microplaque) sans influence sur la détection des métaux et ce jusqu'à 1 mois. Outre ces intérêts techniques et technologiques, la lyophilisation semble également apporter des bénéfices quant à la sensibilité des souches bactériennes bioluminescentes vis à vis de la détection des métaux. En effet, les résultats montrent un abaissement des limites de détection et une sensibilité accrue à la toxicité. L'ensemble de ces points positifs, apportés par la méthode de conservation, tend à favoriser l'utilisation de bactéries lyophilisées dans le cadre du développement d'un outil biologique d'analyse versus des bactéries fraîches.

D'autre part, au vu des spécificités propres à chacune des souches bactériennes inductibles, la bioluminescence seule n'est pas un indicateur suffisant à l'identification et à la quantification des métaux. En effet, les souches bioluminescentes testées répondent à au moins 2 métaux parmi les 15 testés (12 sur 15 pour la souche *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux lyophilisée). Cependant, le phénomène de détection croisée (un métal détecté par plusieurs souches) ainsi que les interactions entre composés sont des voies à explorer, pouvant apporter des éléments de réponse quant à l'identification de métaux par bactéries bioluminescentes. Aussi, nous avons envisagé l'intégration d'un outil statistique d'aide à la décision dans le but d'améliorer l'interprétation des informations de bioluminescence fournies par ces capteurs bactériens.

## **Chapitre 4 : Développement d'un modèle statistique par arbre de décision pour l'aide à l'interprétation des données**

---

Comme démontré dans le chapitre précédent, la faible spécificité des capteurs est un frein important au développement d'un outil analytique reposant sur ces bioéléments. Par conséquent, les données de bioluminescence bactérienne fournies doivent impérativement être associées à un outil d'interprétation. Dans le cadre de cette thèse, nous proposons d'améliorer l'analyse des données à l'aide d'une approche statistique mettant en œuvre un outil initialement dédié à l'exploration de donnée : les arbres de décision. Avec cette méthode, dite « d'apprentissage supervisé », la conception des modèles s'appuie entièrement sur une matrice de données pré-établie.

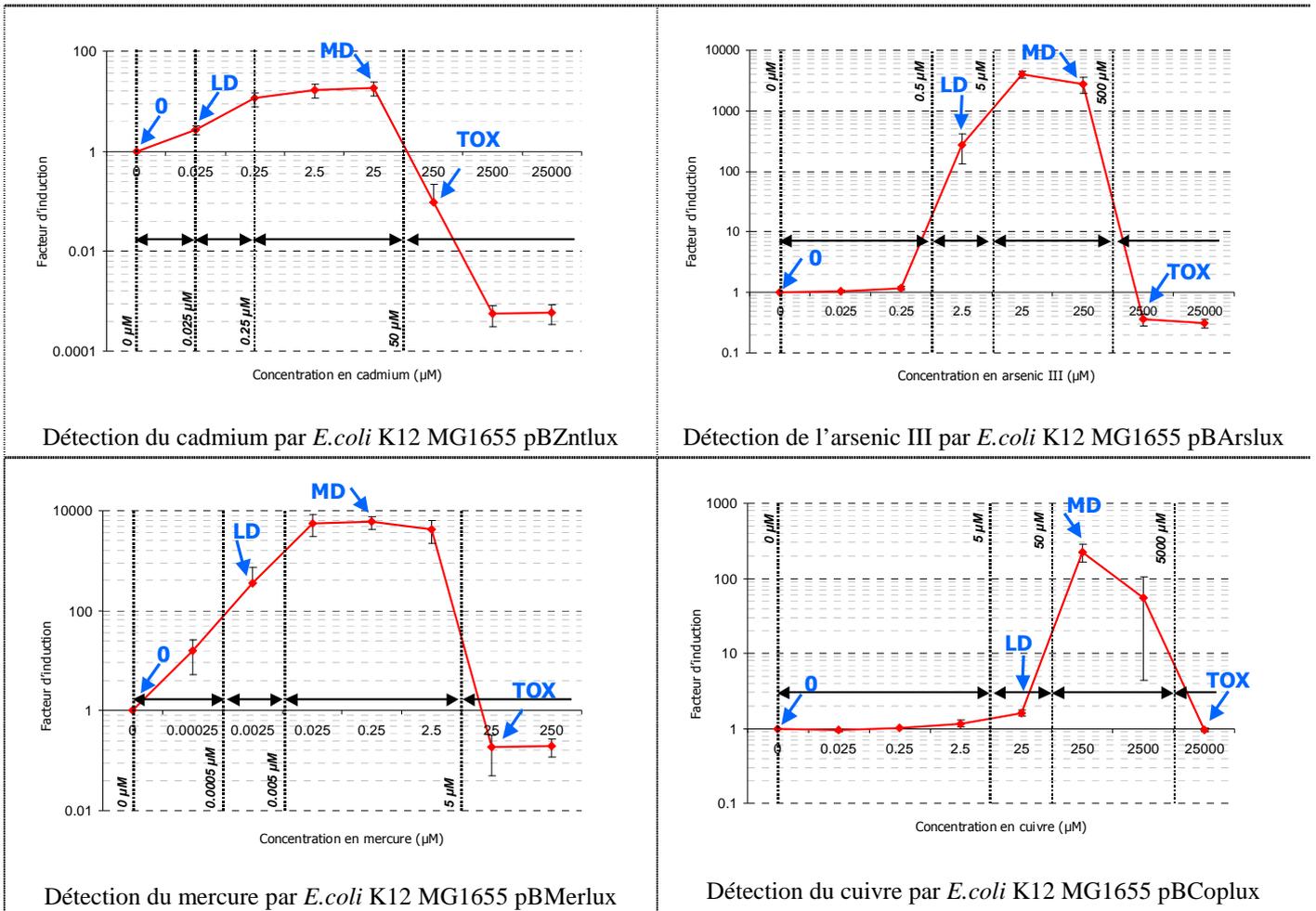
L'objectif de cette partie de thèse était de vérifier l'intérêt de cette association entre réponses bactériennes et analyse statistique au travers de mélanges maîtrisés (eau distillée) contenant jusqu'à 4 métaux (cadmium, arsenic III, mercure et cuivre) à 4 niveaux de concentrations (256 conditions). Ces 4 métaux ont été choisis initialement car ils sont décrits dans la littérature comme « spécifiques » des différentes souches bactériennes inductibles utilisées. Toutefois, ils sont également à l'origine d'induction croisée des autres souches bactériennes. C'est le cas, par exemple, du mercure à l'origine de la production de bioluminescence chez *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux (*souche spécifique*) mais également chez *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux (cf. tableau 19). A partir de ces mélanges de métaux, nous avons pu établir une base de données de réponses induites par les 5 souches bactériennes bioluminescentes nécessaire au développement du modèle statistique par arbre de décision.

L'enjeu de ce modèle était de prédire la présence de ces composées métalliques (information qualitative et semi-quantitative) dans un échantillon inconnu en se basant uniquement sur les niveaux observés de bioluminescence.

#### ***4.1. Détermination des gammes de détection et des concentrations représentatives.***

Afin d'établir la base de données nécessaire à l'apprentissage des arbres de décision, quatre métaux ont été choisis : le cadmium, l'arsenic III, le mercure et le cuivre. Ces métaux font partie de la liste des composés détectés par les souches bactériennes bioluminescentes (cf. paragraphe 3.3.) et sont également responsables des plus fortes intensités de bioluminescence observées avec ces bioéléments.

A partir des courbes bioluminescences/concentrations, obtenues pour chacune des souches bactériennes inductibles, des gammes de détection ont pu être établies. Elles correspondent à des intervalles de concentration dans lesquelles la réponse des souches, en terme d'intensité d'émission de bioluminescence, reste relativement stable (Figure 35).



**FIGURE 35 :** COURBE SPECIFIQUE D'INDUCTION, GAMMES DE CONCENTRATIONS ET CONCENTRATIONS REPRESENTATIVES POUR CHAQUE SOUCHE BACTERIENNE.

Ainsi, à partir de chacune des gammes, une concentration représentative a pu être déterminée. « 0 », « LD », « MD » et « TOX » représentent respectivement l'ensemble des concentrations inférieures à la limite de détection du métal, les concentrations minimales détectées, les concentrations maximales détectées et les concentrations toxiques pour la souche. Dans le cas du cadmium, avec comme souche de référence *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, les gammes de détection et les concentrations représentatives (Figure 35) sont :

- « 0 » représente la gamme [0µM ; 0,025µM[
- « LD » représente la gamme [0,025µM ; 0,25µM[
- « MD » représente la gamme [0,025µM ; 50µM[
- « TOX » représente la gamme [50µM ; + ∞ [

#### 4.2. Acquisition des données

L'objectif de cette phase était de construire la base de données nécessaire à l'apprentissage et à l'évaluation des arbres de décision. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser un plan d'expérience afin de garantir l'homogénéité de l'échantillonnage, ainsi le nombre de conditions à tester est passé de  $4^4$  (=256) à 192 conditions de mélange. Cette étape a été mise

en œuvre avec l'aide de *P. Courcoux* de l'ONIRIS de Nantes. L'enjeu de cette approche était également de valider l'utilisation des plans d'expérience dans un soucis de développement futur. En effet, avec l'introduction de nouvelles variables, par exemple, un métal supplémentaire, le nombre de conditions à réaliser augmente exponentiellement (dans ce cas, le nombre de conditions à tester passe de 256 à 4<sup>5</sup> soit 1024). Avec les plans d'expérience, on peut espérer réduire le nombre de conditions à tester sans perte significative d'informations.

Les données brutes de bioluminescence ont ensuite été converties en logarithme de facteur d'induction ou en facteur d'inhibition. Pour les souches inductibles, les données ont été converties selon la formule suivante :

$$Log(FI) = Log\left(\frac{(BL_{mesurée})}{(BL_{témoin})}\right)$$

Log(FI) : Logarithme du facteur d'induction  
 BL<sub>mesurée</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec l'échantillon testé (RLU.s<sup>-1</sup>)  
 BL<sub>témoin</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec le témoin (eau distillée) (RLU.s<sup>-1</sup>)

Pour la souche constitutive, les données de bioluminescence ont été converties en respectant l'équation ci dessous :

$$TI = 1 - \frac{(BL_{mesurée})}{(BL_{témoin})}$$

TI : Taux d'inhibition d'induction  
 BL<sub>mesurée</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec l'échantillon testé (RLU.s<sup>-1</sup>)  
 BL<sub>témoin</sub> : bioluminescence émise par la souche bactérienne en contact avec le témoin (eau distillée) (RLU.s<sup>-1</sup>).

Cette étape a permis de concevoir une matrice de donnée composés de 553 valeurs soit 192 conditions en 3 réplicats. Le tableau ci-dessous reprend une portion de la matrice globale de données.

Libellé	Concentration				Réponse des souches				
	Cadmium	Arsenic III	Mercuré	Cuivre	Zntlux	Arslux	Merlux	Coplux	Taclux
1113	1	1	1	1	0,17	0,00	-0,49	1,37	0,383
1113	1	1	1	3	0,21	-0,05	-0,73	1,36	0,435
1123	1	1	1	3	0,25	-0,03	-0,49	1,21	0,095
1123	1	1	1	3	0,29	-0,01	-0,51	1,28	0,349
1131	1	1	3	1	0,38	0,02	2,92	0,02	-0,162
1131	1	1	3	1	0,57	0,00	2,85	0,07	-0,351
1132	1	1	3	2	0,17	-0,05	2,85	0,02	-0,131
1211	1	1	1	1	-0,15	-0,02	0,33	-0,05	-0,263

**TABLEAU 20 :** EXTRAIT DE LA MATRICE GLOBALE COMPOSEE DES 553 DONNEES.

Libellé : Identifiant de la condition testée composé des classes de concentrations des 4 métaux d'intérêt.

La concentration de chaque métaux d'intérêt est indiqué par un code. Ces concentrations ont été déterminées préalablement selon les courbes spécifiques d'induction (Figure 35), les codes 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement aux concentrations 0, LD, MD et TOX. Les réponses (en logarithme des facteurs d'induction) ou en taux d'inhibition) des souches bactériennes *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, pBArslux, pBMerlux, pBCoplux et *E.coli* DH1 pBTaclux sont reprises respectivement dans les colonnes Zntlux, Arslux, Merlux, Coplux et Taclux.

### 4.3. Analyses descriptives des données

Afin d'avoir une vue d'ensemble sur les données, une étape d'analyse statistique par analyse factorielle discriminante (AFD) a été réalisée. L'AFD est une méthode permettant de

modéliser l'appartenance à un groupe de données en fonction des valeurs prises par plusieurs variables (niveau de bioluminescence des différentes souches bactériennes), puis de déterminer le groupe le plus probable (concentration en métal recherché) pour un individu, connaissant uniquement les valeurs des variables qui le caractérisent (XLSTAT, Addinsoft™).

Cette étape a permis d'une part d'écartier plusieurs conditions non exploitables pour des raisons de toxicité et d'autre part, de regrouper certaines classes de concentrations non dissociables.

#### 4.3.1. Analyses des données brutes

Dans un premier temps, une AFD par métal recherché a été réalisée sur l'ensemble des données de la matrice globale de 553 expériences (métaux en mélange). La figure 36 reprend l'ensemble des résultats obtenus avec les différents métaux.

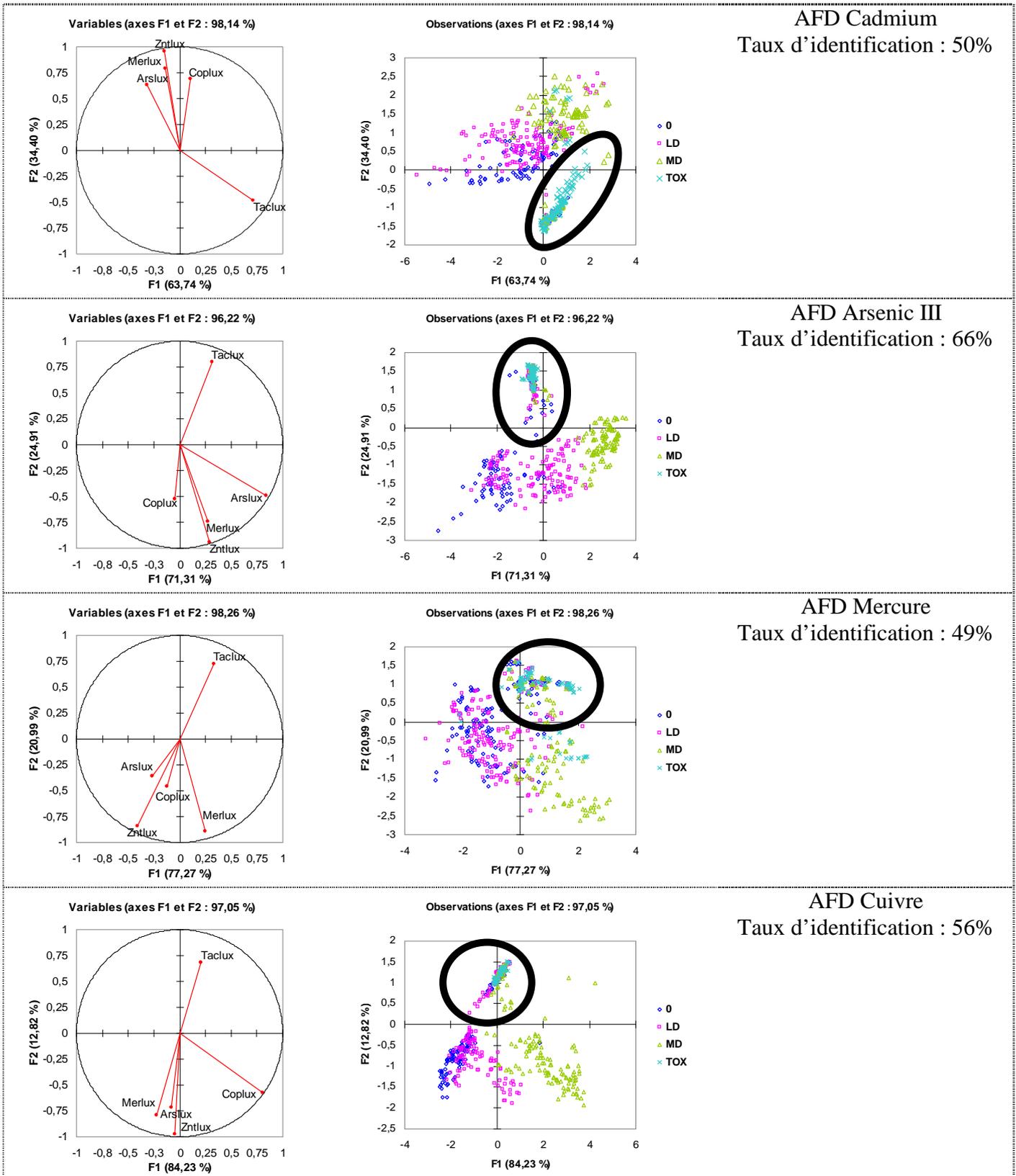
La première colonne à gauche de la figure 36 représente les corrélations variables explicatives/facteurs, les variables explicatives correspondant ici aux différents niveaux de bioluminescence émis par les souches bactériennes. Les projections des données de la matrice globale sur la plan factoriel apparaissent dans la colonne centrale.

Dans le cas du cadmium, les deux fonctions F1 et F2 expliquent 98,14% de la variance totale. La variable "Taclux" (Taux d'inhibition de la souche *E.coli* DH1 pBTaclux) est fortement corrélée avec la fonction F1 (63,74% de la variance totale), alors que la fonction F2 (34,40% de la variance totale) est corrélée avec l'ensemble des autres variables "Zntlux", "Arslux", "Merlux" et "Coplux" qui représentent respectivement les logarithmes des facteurs d'induction des souches *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, pBArslux, pBMerlux et pBCoplux (colonne de gauche). Sur le graphique central, chaque couleur représente une classe de concentration. Ainsi, l'analyse de la projection des données sur le plan factoriel ne permet pas de distinguer les différentes classes de concentration.

Cette confusion entre les classes de concentrations est observée sur l'ensemble des projections et est confirmée par des taux d'identification proche de 50% et ne dépassant pas 66% (cas de l'arsenic III).

Cependant, un groupe de données (données incluses dans le cercle gras et noir) se détache du nuage de points principal. Il est composé de l'ensemble des données de la classes "TOX" ainsi que quelques données des autres classes de concentrations. Après analyse, il s'avère que chacun des points de ce groupe correspondent à un mélange contenant au moins un métal à la concentration "TOX". Cette concentration, toxique pour les bactéries, affecte directement la production de bioluminescence en altérant les cellules et en inhibant la production de bioluminescence. Le signal biologique n'est alors plus interprétable car masqué par l'effet toxique.

Afin de s'affranchir de ce phénomène, les données présentant un taux d'inhibition de la bioluminescence pour la souche constitutive *E.coli* DH1 pBTaclux (témoin de toxicité) supérieur à 96% ont été écartées de la matrice globale obtenant ainsi une matrice réduite composée de 301 expériences.



**FIGURE 36 :** ANALYSES FACTORIELLES DISCRIMINANTES OBTENUES POUR CHACUN DES METAUX A PARTIR DE LA MATRICE GLOBALE DE DONNEES (N=553).

Conditions expérimentales : Analyse statistique réalisée avec XLSTAT (Addinsoft) sur la matrice globale de donnée (n=553). Variable dépendante : concentration en métal, Variables explicatives : Zntlux, Arslux, Merlux, Coplux [Log(Facteur d'induction)] et Taclux [Taux d'inhibition]

### 4.3.2. Analyses des données pré-traitées

Une seconde série d'AFD a été réalisée à partir de la nouvelle matrice (n=301). Les résultats sont repris sur la figure 37.

Dans le cas du cadmium, les fonctions F1 et F2 expriment 100% des variations observées. F1 (98,16% de la variance) est logiquement corrélée avec la variable "Zntlux" ( $R^2 = 0,954$ ). En d'autres termes, la principale fonction discriminante d'identification et de quantification du cadmium représente principalement les niveaux de bioluminescence émis par la souche *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux (souche de référence pour le cadmium). F2 (1,84% de variation) est corrélée avec "Coplux" et "Taflux". La projection des données de la matrice réduite sur le plan factoriel permet de distinguer les trois classes de concentration principalement selon l'axe F1.

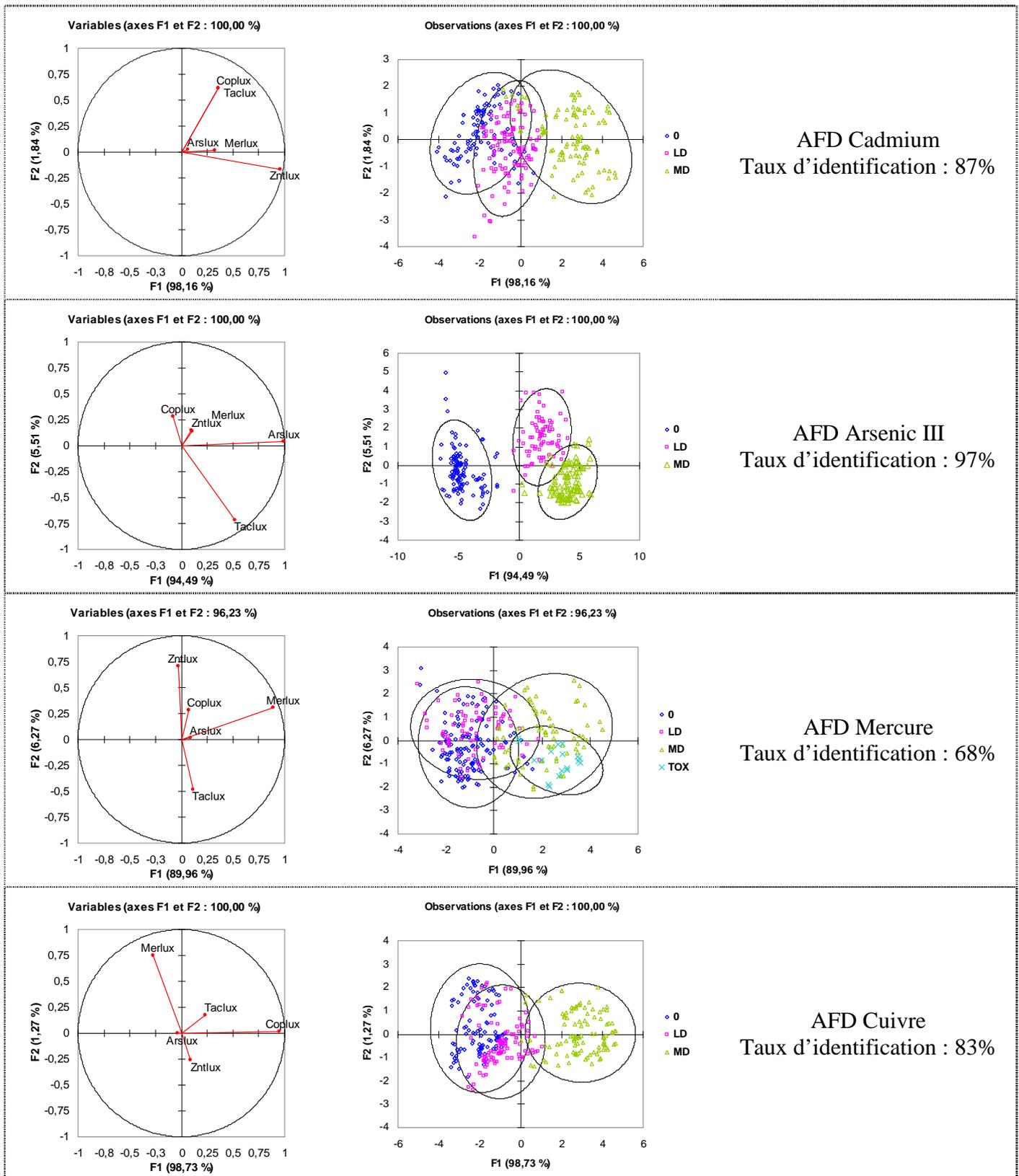
La classe "TOX" n'apparaît plus dans cette nouvelle matrice. En effet, la plupart des expériences intégrant ce niveau de concentration en cadmium dans le mélange ont été écartées car présentant des niveaux de toxicité supérieurs à 96% (taux d'inhibition observé avec la souche *E.coli* DH1 pBTaflux). Certaines conditions contenant la concentration "TOX" pour le mercure apparaissent toutefois dans la figure 37. Après une analyse plus approfondie des données, il apparaît que, dans tous les cas, ces conditions réunissent les concentrations "TOX" pour le mercure et "MD" pour l'arsenic III. Par conséquent, ce dernier (arsenic III) joue un rôle de protecteur vis à vis de la toxicité engendrée par le mercure à la concentration "TOX".

Dans l'ensemble, une augmentation significative des taux d'identification a été constatée. Malgré cela, le taux d'identification pour le mercure ne dépasse pas 70%. Cette amélioration relative provient d'une confusion statistique entre les données de classe "0" (pas de mercure dans l'échantillon) et les données de la classe "LD" (Plus faible concentration détectée par la souche de référence : *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux). Cette classe de concentration "LD", étant trop faible pour être détectée par le panel bactérien actuel, elle a été fusionnée dans la classe "0" permettant au taux d'identification pour le mercure de passer à 87% (figure 38).

### 4.4. Développement des arbres de décision

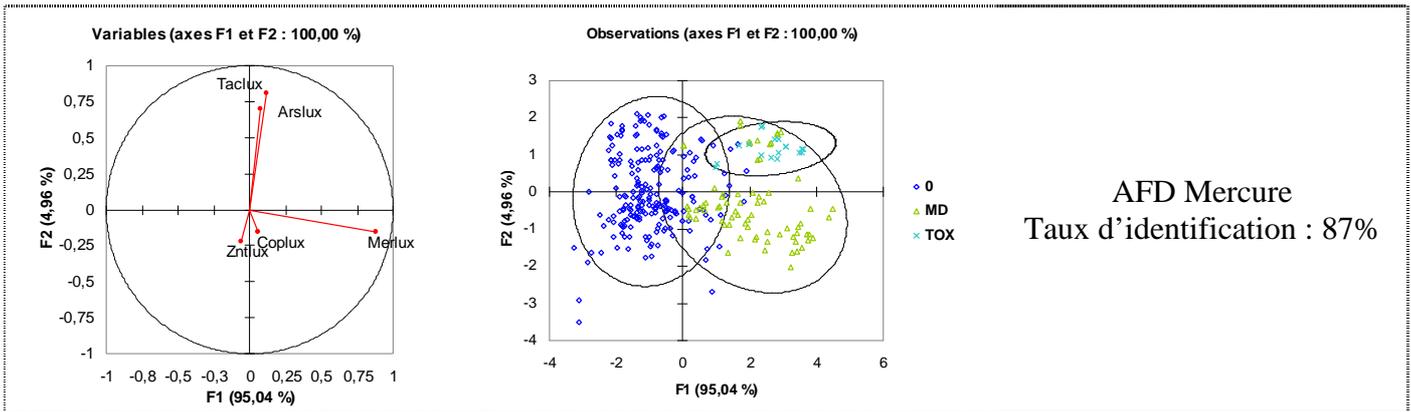
Afin d'améliorer l'identification et la quantification des métaux, nous nous sommes tournés vers l'approche par arbre de décision. Cet outil intuitif et flexible était plus en adéquation avec le modèle primaire d'identification de métaux que nous souhaitions développer.

Les modèles d'arbre ont été élaborés informatiquement à partir de la matrice de donnée composée des 301 expériences sélectionnées (la classe "TOX" a été écartée de la base de donnée initiale pour l'ensemble des métaux, les classes "LD" et "0" du mercure ont fusionnés). Pour cela, les données de la matrice ont été réparties aléatoirement en 2 sous-matrices : une matrice d'apprentissage (70% des expériences) utilisée pour la conception des arbres et une matrice d'évaluation (30%) mise en œuvre pour évaluer les modèles développés (taux d'identification).



**FIGURE 37 :** ANALYSES FACTORIELLES DISCRIMINANTES OBTENUES POUR CHACUN DES METAUX A PARTIR DE LA MATRICE REDUITE DE DONNEES (N=301)

Conditions expérimentales : Analyse statistique réalisée avec XLSTAT (Addinsoft) sur la matrice réduite de donnée (n=301). Variable dépendante : concentration en métal, Variables explicatives : Zntlux, Arslux, Merlux, Coplux [Log(Facteur d'induction)] et Taclux [Taux d'inhibition]

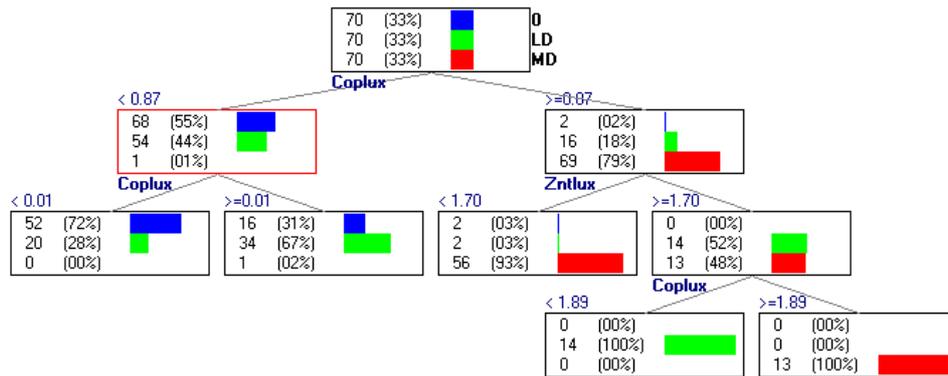


**FIGURE 38 :** ANALYSES FACTORIELLES DISCRIMINANTES OBTENUES POUR LE MERCURE APRES FUSION DES CLASSES DE CONCENTRATION "0" ET "LD" (N=301)

#### 4.4.1. Mise en œuvre du logiciel SIPINA pour le développement des premiers modèles d'arbre de décision.

Le logiciel SIPINA (Zighed *et al.* 1992) est un outil académique d'induction d'arbre de décision qui a été développé par le laboratoire ERIC (Equipe de Recherche en Ingénierie des Connaissances) de l'Université Louis Lumière de Lyon. Cet outil intègre un panel assez complet d'algorithmes d'induction d'arbre (CART, CHAID, ID3, C4.5, ...). Aussi, en appliquant cet outil à notre base de données composée de 301 expériences, nous avons sélectionné l'algorithme qui fournissait les meilleurs taux d'identification des métaux parmi le panel d'algorithmes proposés. Ce choix s'est porté sur l'algorithme Improved CHAID (Indice de segmentation : *t de Tschuprow*).

La figure 39 reprend l'arbre de décision développé par le logiciel SIPINA pour l'identification du cuivre dans un échantillon pouvant contenir jusqu'à 4 métaux (cadmium, mercure, arsenic et cuivre). Initialement, les trois classes de concentration en cuivre "0", "LD" et "MD" sont réparties équitablement dans la matrice d'apprentissage : 70 expériences pour chacune des classes (feuille mère située au sommet de l'arbre). Le premier nœud sépare les données en deux feuilles secondaires : la variable de segmentation de ce premier nœud concerne les logarithmes des facteurs d'induction obtenus avec la souche *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux (valeur du critère de segmentation = 0,87). A ce niveau d'identification, 2 groupes se dessinent : feuille de gauche = classes "0" et "LD", feuille de droite = classe "MD". Afin d'améliorer le caractère discriminant de l'arbre, d'autres nœuds ont été instaurés afin d'obtenir un niveau de pureté convenable pour les feuilles terminales (dernière feuille de chaque branche).



**FIGURE 39 :** ARBRE DE DECISION DEVELOPPE AVEC LE LOGICIEL SIPINA POUR L'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DU CUIVRE

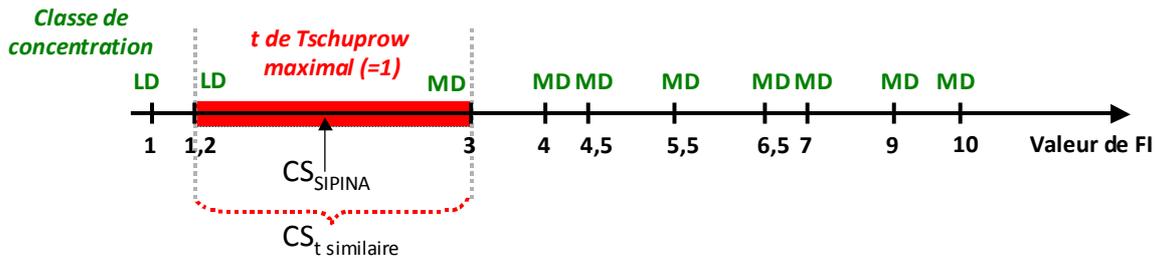
Les effectifs représentés concernent la matrice d'apprentissage. Les données de la matrice d'évaluation ne sont pas prises en compte lors de la construction des modèles.

Les critères de segmentation correspondent à des valeurs de logarithme de facteur d'induction déterminée selon la valeur du t de *Tschuprow*. Ici, l'arbre classe les données de bioluminescence ( $\text{Log}(\text{FI})$ ) d'un échantillon inconnu selon un premier critère lié à l'induction de la souche *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux d'une valeur de 0,87. Les données sont ainsi séparées jusqu'en bas de l'arbre afin de déterminer la classe de concentration associée à l'échantillon testé.

Les arbres développés, spécifique de chaque métal, ont, dans un second temps, été soumis à la matrice d'évaluation (données non prises en compte lors de l'induction des arbres) afin d'évaluer leurs efficacités pour la semi-quantification des métaux (identification correcte de la classe de concentration du métal). Les taux d'efficacité de classement dans le cas de données inconnues sont pour le cadmium, l'arsenic, le mercure et le cuivre, respectivement de 86%, 98%, 91% et 81%.

Deux contraintes du logiciel apparaissent lors de l'induction des arbres. Tous d'abord, comme nous l'avons déjà énoncé précédemment (2.10.3.3. Logiciel Metalsoft développé dans le cadre du projet), l'induction des arbres est entièrement liée à la répartition aléatoire des expériences dans la matrice d'apprentissage. Aussi, une valeur aberrante incluse dans la matrice d'apprentissage peut influencer considérablement l'arbre le rendant ainsi moins pertinent.

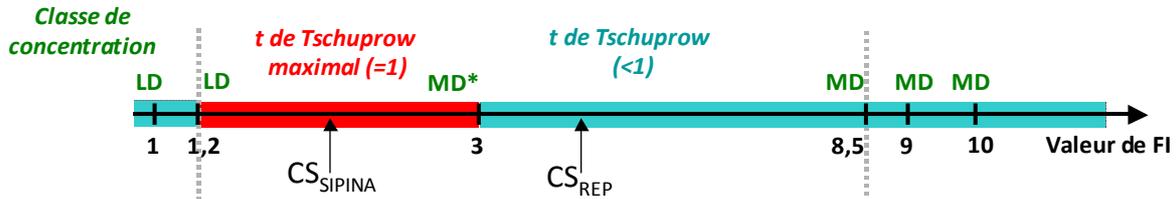
La seconde limite concerne la définition de la valeur du critère de segmentation. En effet, avec SIPINA, cette valeur est calculé uniquement dans l'intervalle où l'indice t de *Tschuprow* est maximal (le plus proche de 1). Elle correspond à la moyenne des bornes supérieure et inférieure des deux groupes segmentés par le critère en question (figure 40).



**FIGURE 40 :** LIMITE DU CALCUL DE LA VALEUR DU CRITERE DE SEGMENTATION MIS EN ŒUVRE PAR LE LOGICIEL SIPINA.

LD et MD sont deux classes de concentrations. FI : Facteur d'induction.  $CS_{SIPINA}$  : Critère de segmentation calculé avec le logiciel SIPINA en fonction des bornes des classes de concentration ( $CS_{SIPINA} = \frac{LD_{max} + MD_{min}}{2} = \frac{1,2 + 3}{2} = 2,1$ ).  $CS_{t\text{ similaire}}$  : Intervalle dans laquelle toutes les valeurs de segmentation présentent un indice t de Tschuprow similaire.

De plus, la détermination du critère de segmentation peut être sur ou sous évalué en présence de valeur aberrantes au niveau des limites des classes (Figure 41). Ainsi le calcul imposé par SIPINA lors de l'évaluation de la valeur du critère de segmentation peut induire des erreurs de classification.



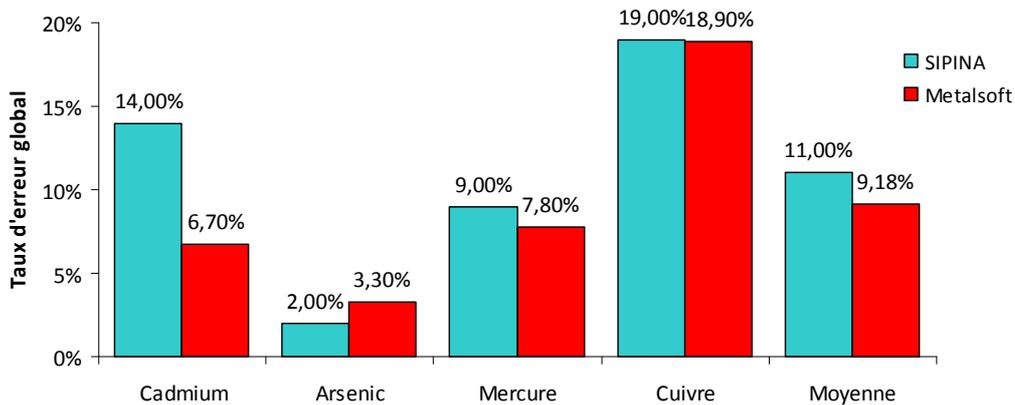
**FIGURE 41 :** LIMITE DU CALCUL DE LA VALEUR DU CRITERE DE SEGMENTATION MIS EN ŒUVRE PAR LE LOGICIEL SIPINA.

LD et MD sont deux classes de concentrations. MD\* : Valeur aberrante de la classe MD. FI : Facteur d'induction.  $CS_{SIPINA}$  : Critère de segmentation calculé avec le logiciel SIPINA en fonction des bornes des classes de concentration.  $CS_{REP}$  : Critère de segmentation plus représentatif mais situé dans une zone avec un indice t de Tschuprow moins important.

Aussi, dans une logique d'amélioration de l'efficacité de classement du modèle, nous avons développé, au sein du laboratoire, un outil informatique permettant l'induction des arbres de décision « Metalsoft » tout en écartant les contraintes imposées par le logiciel SIPINA.

#### 4.4.2. Développement d'un logiciel dédié à l'identification de métaux au laboratoire « Metalsoft »

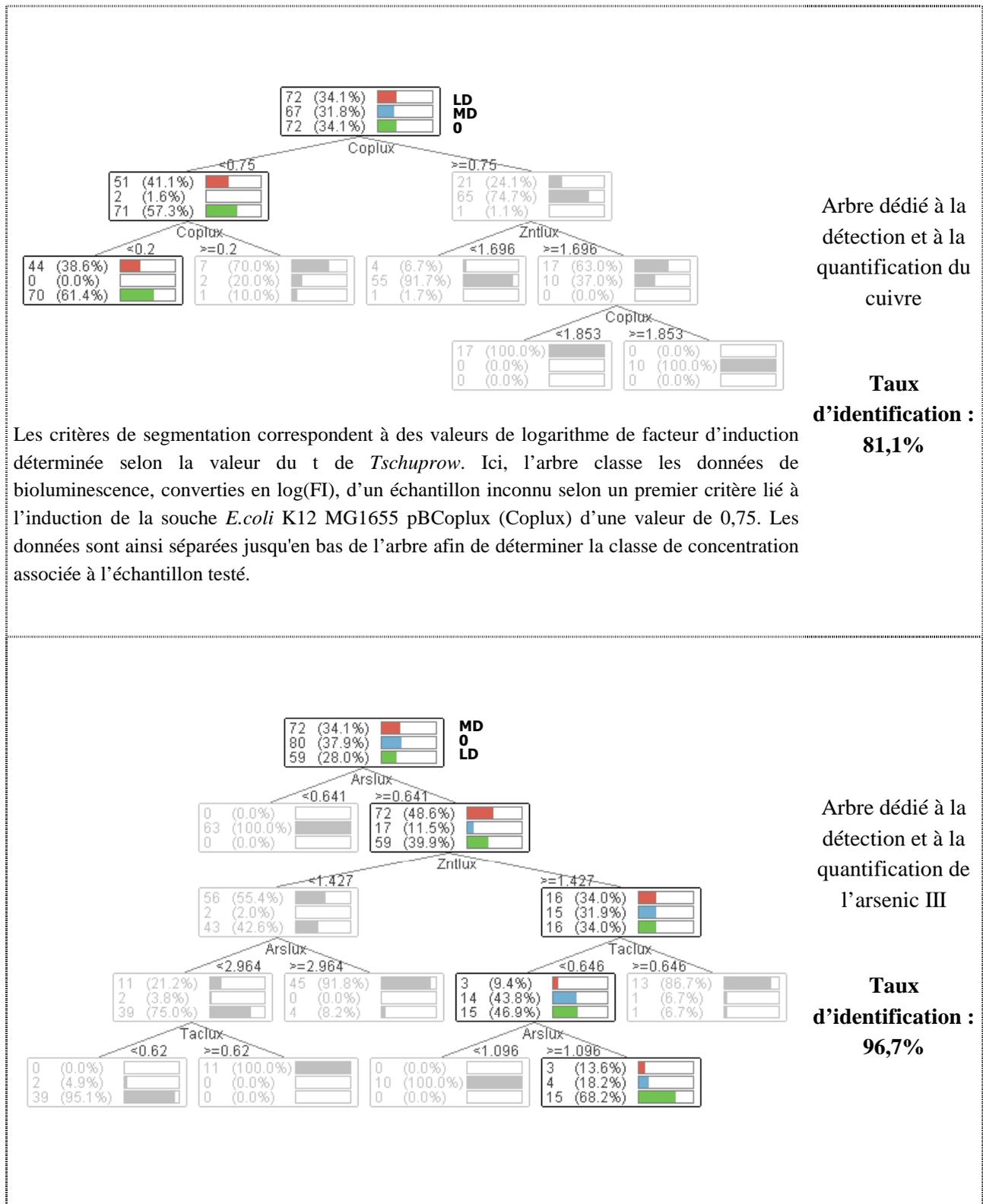
Le logiciel « Metalsoft » a été développé en collaboration avec Thomas BLUSSEAU (étudiant en Master Professionnel de Bio-informatique à l'Université de Nantes). Ce nouvel outil reposant sur l'algorithme Improved CHAID a permis d'améliorer légèrement le taux d'efficacité moyen de classification d'environ 2 % (Figure 42).



**FIGURE 42 :** COMPARAISON ENTRE LES TAUX D'EFFICACITE DE CLASSIFICATION D'ECHANTILLONS INCONNUS OBTENUS A PARTIR DES ARBRES CONÇUS AVEC SIPINA ET DES ARBRES CONÇUS AVEC METALSOFT.

Les taux d'erreurs représentés ont été calculés à partir de la matrice d'évaluation (91 expériences). Cette matrice est composée d'échantillons inconnus contenant jusqu'à 4 métaux en mélange (cadmium, arsenic III, mercure et cuivre).

Les arbres de décision développés avec Metalsoft sont repris dans les figures 43 et 44.



**FIGURE 43 :** ARBRES DE DECISION SPECIFIQUES DU CUIVRE ET DE L'ARSENIC III DEVELOPPES PAR METALSOFT

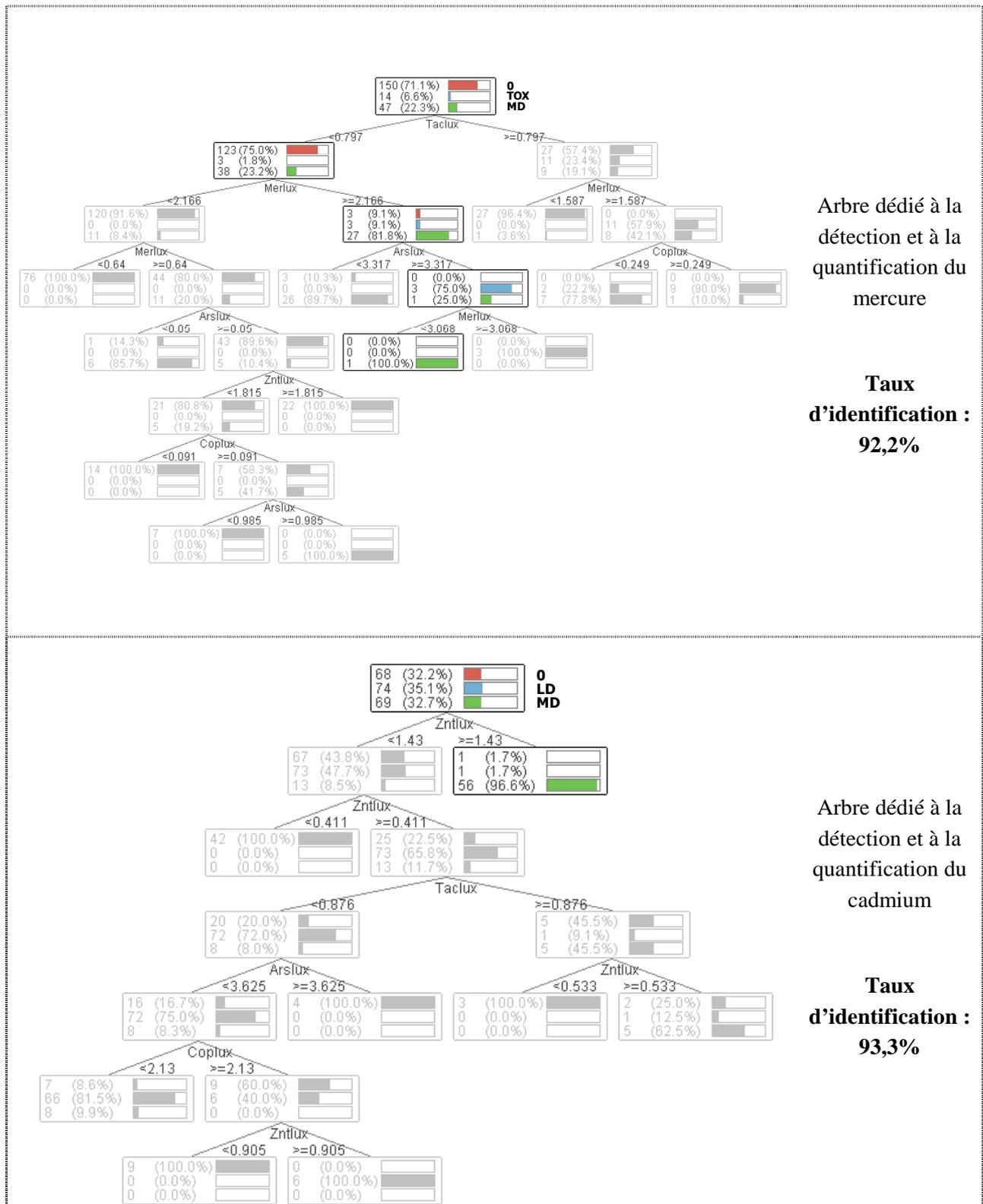


FIGURE 44 : ARBRES DE DECISION SPECIFIQUES DU MERCURE ET DU CADMIUM DEVELOPPES PAR METALSOFT

Outre le module de construction des arbres de décision, le logiciel « Metalsoft » intègre un second module dédié à l'analyse des données de bioluminescences fournies par les cinq souches bactériennes. Ce dernier calcule, à partir des données brutes de bioluminescence, les logarithmes des facteurs d'induction. De plus, son interface graphique intuitive permet une lecture rapide des résultats (Concentrations en métal). La figure 45 est une capture du module d'analyse de « Metalsoft ».

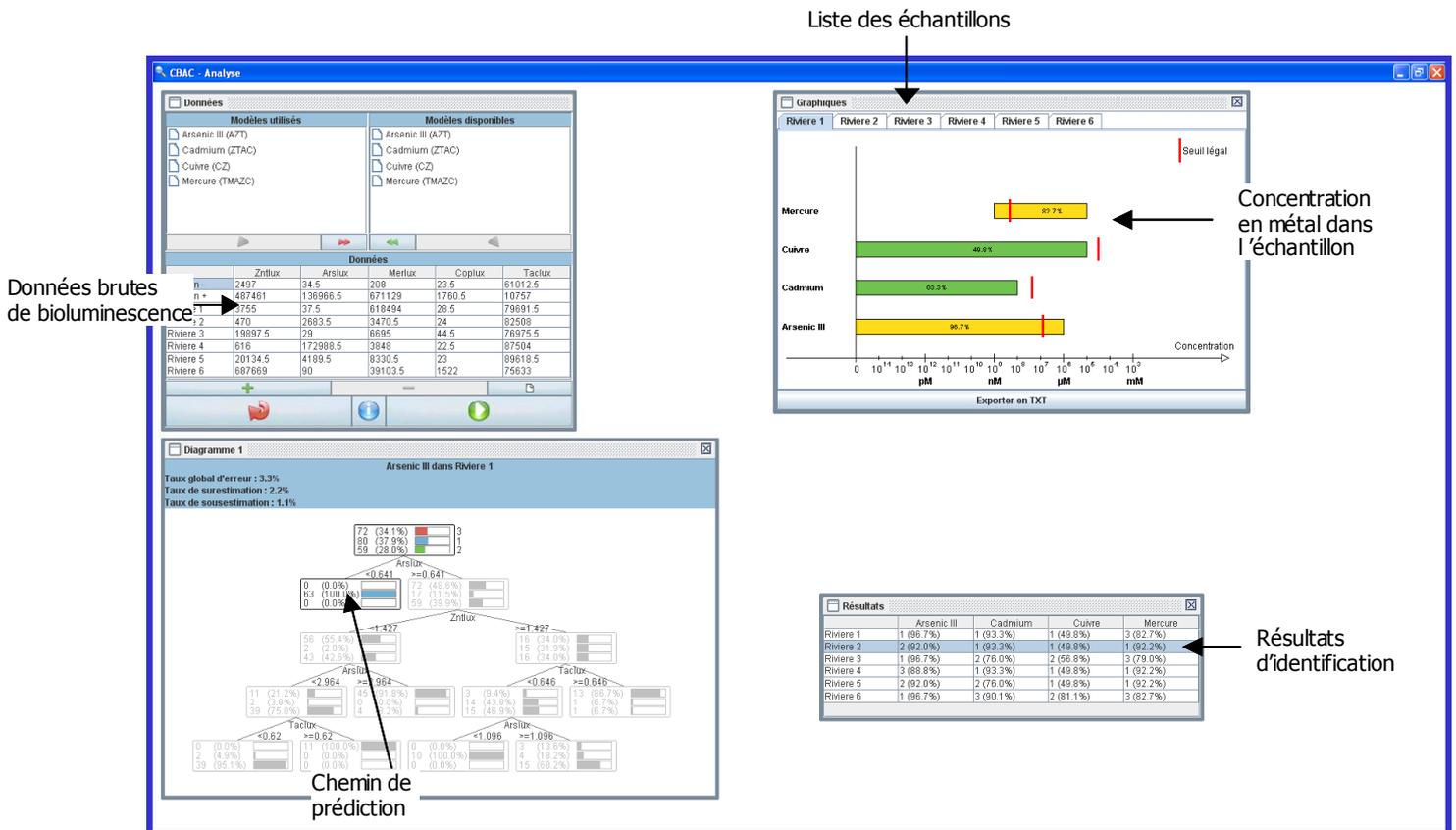


FIGURE 45 : CAPTURE D'ECRAN DU MODULE D'ANALYSE INCLUS DANS LE LOGICIEL « METALSOFT ».

### 4.5. Validation des arbres de décision sur des matrices environnementales

Afin de valider l'approche par arbre de décision dans le cadre de la détection des métaux par capteurs bactériens bioluminescents, le système a été soumis à 18 échantillons industriels ou environnementaux contenant différentes concentrations en métaux (contamination artificielle cf. paragraphe 2.3.4.2).

Les échantillons d'industrie métallurgique (tableau 21, EIM-x) proviennent de la station de traitement des eaux usées de l'entreprise ArcelorMittal Packaging de Basse-Indre, implantée sur la rive nord de la Loire, à dix kilomètres de Nantes. Le site est spécialisé dans la production d'acier sans étain. Ces échantillons sont caractérisés par une charge importante en oxyde de fer, un pH légèrement basique (entre 7,8 et 8,2) et une conductimétrie de l'ordre de

9,6 ( $\pm 1,1$ ) mS.cm<sup>-1</sup>. La turbidité observée dans ces échantillons varie entre 900 NTU (Nephelometric Turbidity Unit) en amont de la station et 15 NTU après traitement. Les échantillons notés ER-x dans le tableau 21 correspondent à des prélèvements d'eau de rivière réalisés en amont du barrage de Moulin Papon à la Roche sur Yon (85000). Ces échantillons sont caractérisés par un pH proche de 7,4, une conductimétrie faible de 0,25 mS.cm<sup>-1</sup> et une turbidité de 18 NTU. Enfin, les échantillons ESE-x dans le tableau 21 ont été prélevés en sortie de la station d'épuration de Moulin Grimaud (85000 La Roche sur Yon). Cette station gère le traitement de l'eau de la ville de la Roche sur Yon soit environ 50000 équivalent habitants. Le pH, la conductimétrie et la turbidité mesurés dans ces échantillons sont respectivement de : 7,4 , 0,9 mS.cm<sup>-1</sup> et 4 NTU.

Les résultats obtenus par méthode biologique ont été ensuite comparés aux données fournies par analyses chimiques conventionnelles dans le but d'estimer l'efficacité du modèle par arbres de décision. Les données issues de ces deux méthodes sont reprises dans le tableau 21.

**TABLEAU 21 :** COMPARAISON ENTRE ANALYSES CHIMIQUES CONVENTIONNELLES ET ANALYSES PAR NOTRE SYSTEME BIO-STATISTIQUE.

Nom de l'échantillon	Analyse chimique				Analyse biologique (prédiction par arbre de décision)			
	cadmium	arsenic III	mercure	cuivre	cadmium	arsenic III	mercure	cuivre
LD	2nM	13,5 nM	250pM	1,5 µM	25 nM	500 nM	500 pM	5 µM
EIM-1	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-2	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-3	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-4	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-5	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-6	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-7	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-8	-	-	-	-	-	-	-	-
EIM-9	<b>141,6 nM</b>	<b>10,56 µM</b>	3,48 µM	-	<b>250 nM - 50 µM</b>	<b>500 nM - 5µM</b>	500 pM - 5 µM	-
EIM-10	<b>57,8 nM</b>	-	-	-	-	-	-	-
ER-11	-	20nM	1,4 µM	-	-	-	500 pM - 5 µM	-
ER-12	-	688 nM	-	-	-	500 nM - 5µM	-	-
ER-13	142,5 nM	-	109,9 nM	49,52 µM	25 nM - 250 nM	-	500 pM - 5 µM	5 µM - 50 µM*
ER-14	-	8,46 µM	-	-	-	5 µM -500 µM	-	-
ER-15	125,2 nM	769 nM	-	-	25 nM - 250 nM	500 nM - 5µM	-	-
ER-16	3,45 µM	178 nM	107,4 nM	<b>47,44 µM</b>	250 nM - 50 µM	-	500 pM - 5 µM	<b>50 µM - 500 µM*</b>
ESE-17	17,4 nM	640 nM	1,11 µM	-	-	500 nM - 5µM	500 pM - 5 µM	-
ESE-18	17,9 nM	-	-	171,35 µM	-	-	-	50 µM - 500 µM*

LD : Limite de détection de la méthode ; - : Pas de métal détecté ; EIM : Eau d'industrie métallurgique ; ER : Eau de rivière ; ESE : Eau de station d'épuration ; \* : gamme de concentration la plus haute concentration prédite.

Dans la plupart des cas (95%), les gammes de concentration prédites par le modèle statistique correspondent aux dosages réalisés par méthodes chimiques. Les erreurs d'identification (valeurs en gras et soulignées dans le tableau) constatées correspondent à des valeurs limites situés aux frontières des gammes de détection. C'est le cas, par exemple, de l'échantillon d'eau de rivière ER-16 : selon la méthode biologique, la concentration en cuivre présente dans l'échantillon est comprise entre 50 $\mu$ M et 500 $\mu$ M alors que le dosage chimique indique une concentration de 47,44 $\mu$ M.

#### **4.6. Conclusion**

Le couplage entre bactéries lyophilisées en microplaque et l'analyse statistique par arbres de décision des données biologiques de bioluminescence facilite considérablement l'interprétation des données. En effet, l'analyse par arbre de décision des données de bioluminescences des 5 souches bactériennes obtenue à partir des échantillons environnementaux ont permis d'identifier (présence de métal) quatre métaux (cadmium, mercure, arsenic III et cuivre) avec une efficacité globale de 98,6% (94 % pour le cadmium, 100% pour l'arsenic III, 100% pour le mercure et 100% pour le cuivre).

De plus, ce modèle permet également une approche semi-quantitative des concentrations en métal présent dans l'échantillon analysé. Dans ce cas, les arbres ont permis d'estimer le niveau des différentes concentrations métalliques avec une efficacité de prédiction pour le cadmium, l'arsenic III, le mercure et le cuivre de, respectivement, 89%, 95%, 100% et 94%.

**Chapitre 5 : Caractérisation biologique du biocapteur  
LUMISENS III**

---

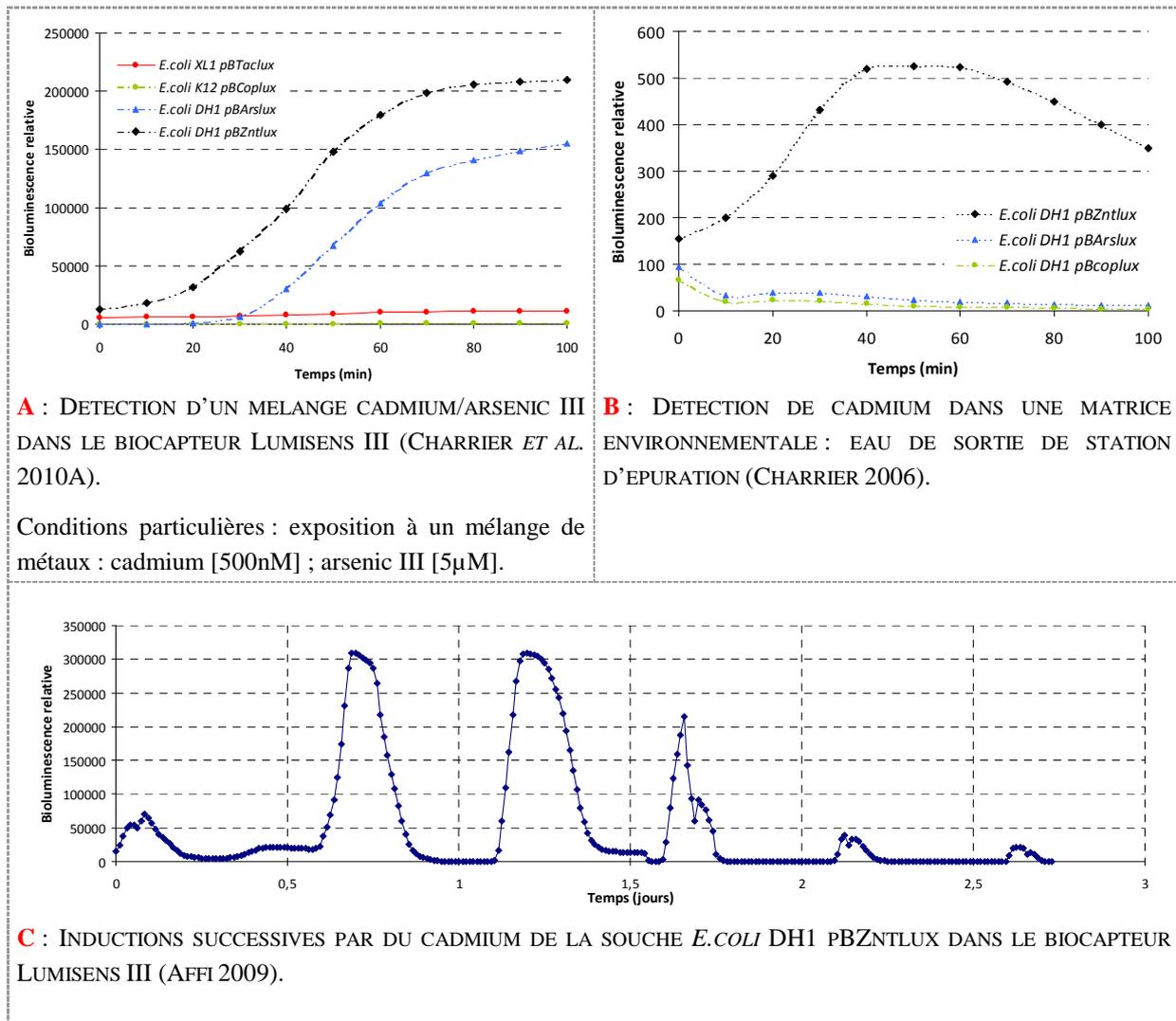
Les biocapteurs bactériens bioluminescents apparaissent comme des outils intéressants dans un contexte de gestion environnementale et/ou de suivi de pollutions notamment métalliques (cf. paragraphe 1.4). Toutefois, le développement de ces outils analytiques se limite, dans la plupart des cas, à une simple étude de la faisabilité en conditions contrôlées de laboratoire, sans caractérisation pertinente des performances (limites du système) ni applications à l'environnement.

L'objectif de ce chapitre est d'éclaircir ces points au travers du biocapteur Lumisens III. Ce système a été développé par T. Charrier (Université de Nantes) en 2006 avec la collaboration de l'Université du Maine. C'est un biocapteur dédié au suivi des niveaux de pollutions métalliques dans l'eau qui s'appuie sur le principe de la reconnaissance biologique des polluants d'intérêt par des bactéries bioluminescentes. Avec ce système, les bactéries sont immobilisées dans un hydrogel d'agarose à 2% au sein d'une carte multi-puits. Les bactéries sont en contact perpétuel avec un liquide circulant permettant de les alimenter en nutriments et en oxygène et de les exposer à un échantillon à analyser. La bioluminescence est mesurée dans ce système à l'aide d'une caméra CCD refroidie afin de réaliser une capture générale de l'ensemble de la carte multi-puits.

Les travaux préliminaires (Charrier *et al.* 2010A) ont montré que le système Lumisens III pouvait être un outil pertinent dans un contexte d'analyse multi-paramétrique pour le suivi des pollutions aquatiques (utilisation simultanée de plusieurs souches bactériennes bioluminescentes, système prévu initialement pour recevoir jusqu'à 64 souches bactériennes bioluminescentes). En effet, la figure 46-A reprend un exemple d'analyse multi-paramétrique avec un échantillon contenant simultanément du cadmium (500nM) et de l'arsenic III (5µM). La présence de ces 2 composés engendre l'induction des souches *E.coli* DH1 pBARslux (induite par l'arsenic III mais pas par le cadmium) et de *E.coli* DH1 pBZntlux (induite par le cadmium mais pas par l'arsenic III). Lumisens III permet ainsi de révéler la présence de ces deux composés dans l'échantillon analysé. Cependant, certains points restent à évaluer.

En effet, une brève étude de détection en conditions environnementales a été réalisée montrant la capacité du biocapteur à mettre en évidence la présence de cadmium (5µM) dans un échantillon d'eau de sortie de station d'épuration (Figure 46-B). Cette étude se limite toutefois à quelques heures et ne permet pas d'évaluer l'impact de la matrice environnementale sur les capteurs biologiques sur le moyen et long terme (Charrier 2006).

D'autre part, les travaux réalisés par M.Affi sur Lumisens III (Affi 2009) ont permis de mettre en évidence une instabilité du signal de bioluminescence dans la durée (figure 46-C). En effet, dès le 2<sup>ème</sup> jour d'utilisation en continu du biocapteur, on observe une baisse de la production de bioluminescence. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'instabilité observée comme la croissance des bactéries en début d'expérience (phénomène démontré dans l'étude), le changement de métabolisme de la souche lié aux mécanismes de résistance aux métaux (adaptation au polluant, régulation interne du promoteur inductible *pZntA*) ou encore une limitation d'un (ou de plusieurs) élément(s) nécessaire(s) à la réaction de bioluminescence.



**FIGURE 46 :** ETUDE DE FAISABILITE REALISEE AVEC LUMISENS III

Conditions expérimentales : Bactéries immobilisées à l'aide d'une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm}=0,1$ ) dans les puits d'une carte multi-puits. Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50µg/ml d'ampicilline. Expositions à 500nM de cadmium durant 120 minutes. Temps de régénération de 150 minutes. Consigne de température fixée à 30°C. La bioluminescence est mesurée par une caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute).

### 5.1. Stabilité du système dans le temps

Le premier point abordé dans ce chapitre s'attache à évaluer la stabilité du système dans le temps en conditions contrôlées de laboratoire, l'objectif étant d'expliquer la perte du signal observé après 2 jours d'analyse dans le biocapteur Lumisens III (Figure 46-C). La première hypothèse envisagée pour expliquer le phénomène observé concerne l'adaptation au polluant : des bactéries exposées évacuent plus rapidement le polluant hors de la cellule contrairement à des bactéries non exposées, par conséquent il y a moins de polluants disponibles dans le milieu intracellulaire pour induire de la bioluminescence chez les bactéries déjà exposées. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi la souche *E. coli* K12 MG1655 pBMerlux qui possède une construction génétique pour l'induction de la bioluminescence différente de la

souche *E.coli* DH1 pBZntlux (promoteur inductible non issu du chromosome de la cellule hôte).

### **5.1.1. Etude du fonctionnement du biocapteur *Lumisens III* avec la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux : promoteur extra-cellulaire.**

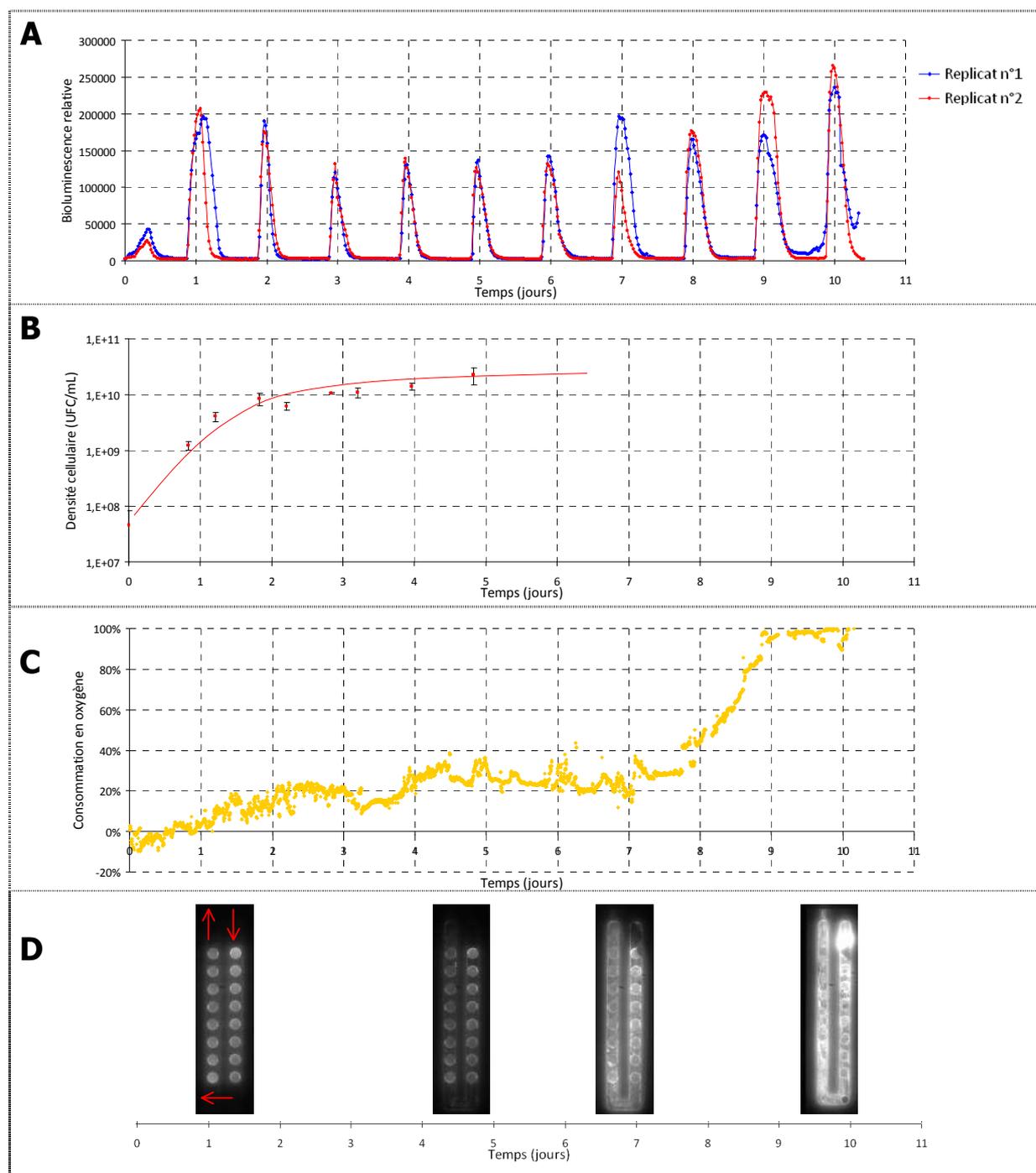
Dans la plupart des cas, les promoteurs choisis pour induire de la bioluminescence en présence de métaux proviennent d'opérons chromosomiques impliqués dans les mécanismes de résistance à un polluant déterminé, propre à la cellule hôte (Charrier 2006). Ces opérons de résistance sont naturellement régulés au sein de la cellule notamment au niveau des promoteurs. Par conséquent, il est tout à fait envisageable que ces régulations puissent également intervenir sur ces promoteurs inclus dans de nouvelles constructions génétiques (plasmide contenant l'opéron *lux* sous le contrôle d'un de ces promoteurs inductibles) et d'interférer sur la réponse de bioluminescence attendue.

Aussi, afin de limiter au maximum les éventuelles régulations métaboliques, nous avons choisi, dans un premier temps, comme souche bactérienne de référence : la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux. En effet, parmi les souches bactériennes bioluminescentes inductibles disponibles au laboratoire, *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux est la seule qui possède une construction plasmidique dont le promoteur de la bioluminescence n'est pas originaire du chromosome bactérien de *E.coli* mais issu du plasmide pDG106 (Gambill and Summers 1985).

#### *5.1.1.1. Simulation de pollution quotidienne par du mercure.*

L'enjeu de cette première phase de l'étude était de caractériser la réponse de la souche bactérienne *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux, immobilisée dans le bio-système et exposée quotidiennement à la même dose de polluants : 500 nM de mercure durant une période de 100 minutes. Les niveaux de bioluminescence produits par la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux en fonction du temps sont repris sur la figure 47-A.

Les résultats observés sont en contradiction avec les données obtenues précédemment sur ce même biocapteur (cf. figure 46-C). En effet, aucune disparition totale du signal de bioluminescence n'a été observée mais inversement, on remarque plutôt un emballement de la bioluminescence en fin d'expérience. La différence de souche bactérienne est la première hypothèse avancée à ce stade de l'étude.



**FIGURE 47 :** COURBE D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE *E. COLI* K12 MG1655 pBmerlux DANS LE CAS D'UNE SIMULATION DE CONTAMINATION QUOTIDIENNE PAR DU MERCURE ET ANALYSES COMPLEMENTAIRES.

Conditions expérimentales d'utilisation du biocapteur Lumisens III : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de mercure durant 100 minutes. ( $\rightarrow$ ) Sens de circulation des liquides dans la carte. A : Suivi de la bioluminescence produite par *E. coli* K12 MG1655 pBmerlux exposée quotidiennement à du mercure par caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute), B : Densité cellulaire dans les matrices d'agarose contenant les bactéries en fonction du temps, C : Oxygène dissous consommé par les bactéries immobilisées dans la carte multi-puits, D : Photographies des bactéries immobilisées dans la carte réalisée par la caméra CCD à différents instants de l'expérience.

Un premier constat met en évidence une relative instabilité du signal de bioluminescence dans le temps malgré une période d'équilibre entre le troisième jour et le sixième jour. Après une analyse plus approfondie des résultats, le graphique peut être découpé en trois phases chronologiques :

- Du jour 0 au jour 2 (inclus), les courbes obtenues avec les 2 réplicats sont quasiment superposables tant au niveau de l'allure générale qu'au niveau des maxima d'induction. Cependant, d'importantes variations sont observées entre les différentes inductions. Les bactéries sont dans une phase de croissance reproductible, mais n'ont pas encore atteint un état d'équilibre.
- Du jour 3 au jour 6 (inclus), les bactéries sont dans une phase de stabilité, le signal de bioluminescence est reproductible et répétable.
- Enfin, à partir du jour 7, les bactéries entrent dans une nouvelle phase d'instabilité cependant, il n'y a plus de reproductibilité entre les réplicats. Le système n'est plus maîtrisé.

Afin de mieux comprendre ces 3 phases, des analyses complémentaires ont été effectuées : croissance bactérienne dans le biocapteur *Lumisens III*, oxygène consommé par les bactéries immobilisées et colonisation du système par du biofilm. Les données obtenues apparaissent dans la figure 47 (respectivement 47-B, 47-C et 47-D).

L'étude de la croissance bactérienne au sein du bio-système (figure 47-B) a permis de comprendre la première phase observée d'induction (J0-J2). En effet, cette dernière est totalement corrélée avec la phase de croissance exponentielle des bactéries immobilisées. L'augmentation de la densité cellulaire et l'état physiologique des bactéries (en phase de croissance exponentielle) durant cette phase peuvent expliquer les différences de production de bioluminescence mesurées entre les inductions quotidiennes par le mercure. A partir du jour 3, les bactéries immobilisées entrent dans une phase de croissance stationnaire (phase d'équilibre) en corrélation avec la phase de stabilité des inductions observées du jour 3 au jour 6.

Le profil de l'oxygène consommé par les bactéries suit également les phases exponentielle et stationnaire mises en évidence par l'étude de la croissance bactérienne : augmentation de la consommation de 0 à 20 % de l'oxygène dissous du jour 0 au jour 2 puis stabilisation de la consommation autour de 20% durant l'ensemble de la période de stabilité. Toutefois, on remarque une reprise importante de la consommation en oxygène autour du jour 7. Cette reprise correspond à la dernière phase d'induction observée : phase d'instabilité non reproductible. Cette reprise traduit une augmentation importante de la densité cellulaire au sein du biocapteur *Lumisens III*.

Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous nous sommes intéressés à la colonisation des surfaces du support des bactéries immobilisées (2.1.1.2. Carte 2 : Mono-canal). Les images qui apparaissent sur la figure 47-D sont des photographies obtenues à partir de la caméra CCD du biocapteur *Lumisens III*. Sur les photographies réalisées au jour 1 et au jour 5, les bactéries

sont confinées dans les puits de la carte contrairement aux jours 7 et 10 où elles ont colonisé tout le support. On constate une émission de bioluminescence en dehors des puits qui perturbe la mesure de la bioluminescence propre aux bactéries immobilisées expliquant ainsi les variations des niveaux d'induction observés à partir du jour 7.

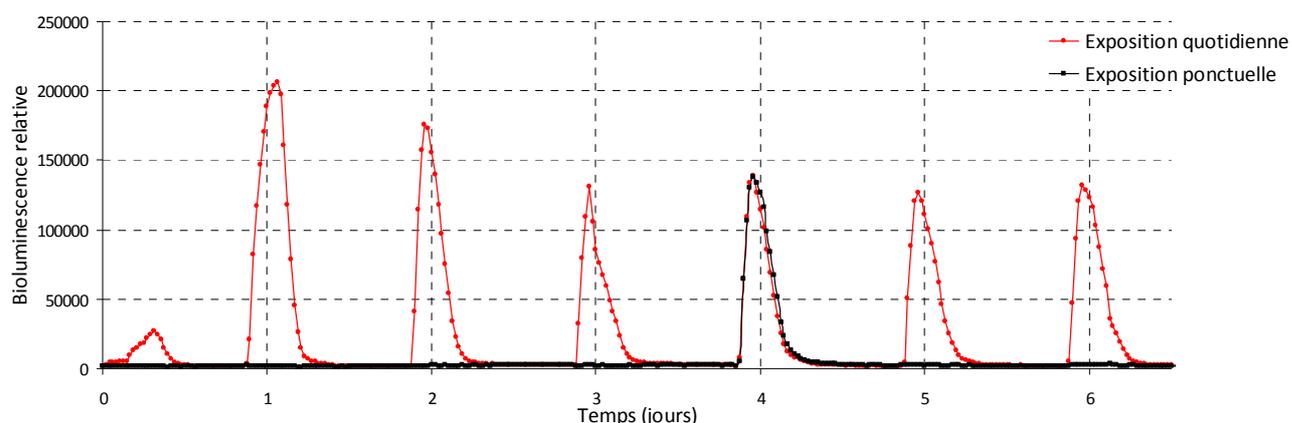
Cette étude a permis de fixer à 7 jours la durée d'utilisation du système actuel sachant que les trois premiers jours doivent être consacrés à la stabilisation des bio-éléments.

Ces résultats soulèvent d'autres problèmes liés à la mobilité bactérienne :

- En raison des contaminations inter-puits, la configuration multi-souche dans une même carte n'est plus envisageable. A chaque souche doit être associée une carte et un canal fluide isolé.
- De plus, la mobilité des bactéries peut engendrer du relargage de bactéries modifiées dans l'environnement (cf. paragraphe 5.2.2.).

#### 5.1.1.2. Simulation de pollution ponctuelle par du mercure.

Afin de lever l'hypothèse de l'adaptation des bactéries au polluant, émise lors des travaux antérieurs de T.Charrier et M.Affi, un second point a été étudié afin d'évaluer l'influence d'expositions antérieures au mercure sur la détection.



**FIGURE 48 :** EFFET D'EXPOSITIONS ANTERIEURES AU MERCURE SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE *E. COLI* K12 MG1655 pBMerLUX DANS LUMISENS III

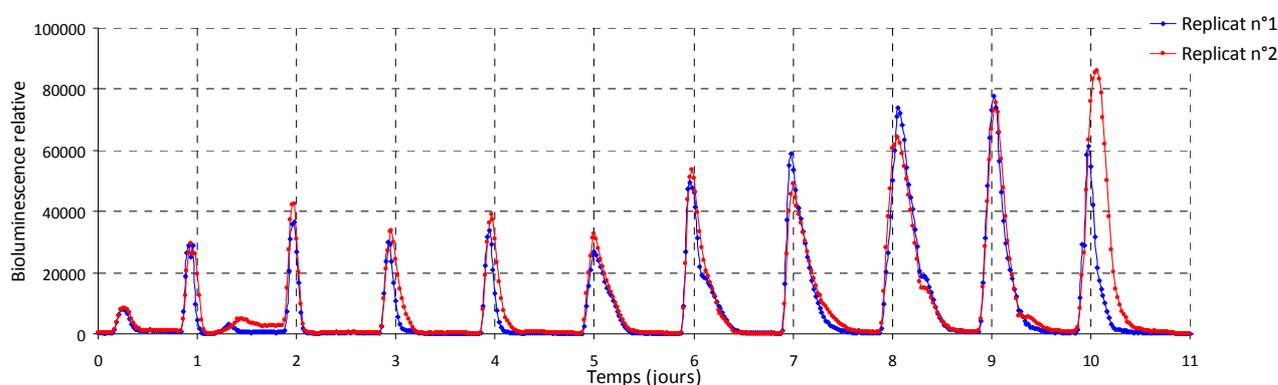
Conditions expérimentales : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complétement de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes ou accidentelles à 500nM de mercure durant 100 minutes. La bioluminescence est mesurée par une caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute).

L'enjeu était de comparer le niveau de bioluminescence produit par des bactéries exposées quotidiennement à du mercure avec le niveau produit par des bactéries n'ayant jamais été exposées au polluant. Afin de s'affranchir des phénomènes d'évolution biologique démontrés dans le paragraphe précédent, les bactéries non exposées ont été placées dans les mêmes conditions que les bactéries exposées (immobilisation dans une matrice d'agarose, apport de nutriments et d'oxygène par le milieu circulant : Ac1/10,...). Ces dernières ont été exposées au mercure uniquement au jour 4. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 48.

L'analyse des données obtenues n'a pas permis d'établir de différence significative entre les bactéries exposées quotidiennement au polluant (mercure à 500nM) et les bactéries exposées ponctuellement. En d'autre terme, la réponse des bactéries ne semble pas être influencée par la durée écoulée dans le biocapteur avant la première exposition.

### 5.1.2. Etude du fonctionnement du biocapteur Lumisens III avec la souche *E.coli* MG1655 pBZntlux : promoteur intracellulaire

Dans un second temps, l'étude s'est orientée vers une seconde souche bactérienne inductible : la souche *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux. Contrairement à *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux, la construction plasmide responsable de la détection des métaux de cette souche possède un promoteur inductible issue du chromosome bactérien de *E.coli* (souche hôte). Par conséquent, ce promoteur peut être potentiellement régulé par le métabolisme propre à la bactérie.



**FIGURE 49 :** COURBE D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE *E.COLI* K12 MG1655 pBZNTLUX DANS LE CAS D'UNE SIMULATION DE CONTAMINATION QUOTIDIENNE PAR DU CADMIUM.

Conditions expérimentales : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de cadmium durant 100 minutes. La bioluminescence est mesurée par une caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute).

Les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus avec la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux. Les trois premières inductions sont reproductibles mais les maxima d'induction varient selon les jours d'exposition, les bactéries sont en phase de croissance exponentielle. A partir du jour 3, les bactéries entrent dans une phase d'équilibre, il n'y a pas encore de colonisation bactérienne du support perturbant la mesure du signal de bioluminescence. Enfin, à partir du jour 6, on note une augmentation significative de l'amplitude du signal biologique mesuré corrélée avec l'apparition d'un biofilm au niveau des paroi du support (carte monocanal).

Le promoteur inductible, responsable de l'induction de l'opéron *lux*, ne semble pas être affecté par le métabolisme de résistance mise en œuvre par la cellule. D'autre part, on constate toujours une contradiction entre les résultats obtenus par M.Affi dans l'étude précédente (cf. figure 46-C) et ces nouveaux résultats. La souche bactérienne ne semble pas être à l'origine des différences de profils d'induction observées. A ce stade de l'étude,

l'hypothèse la plus probable concerne des contaminations microbiologiques responsables de la perturbation du système.

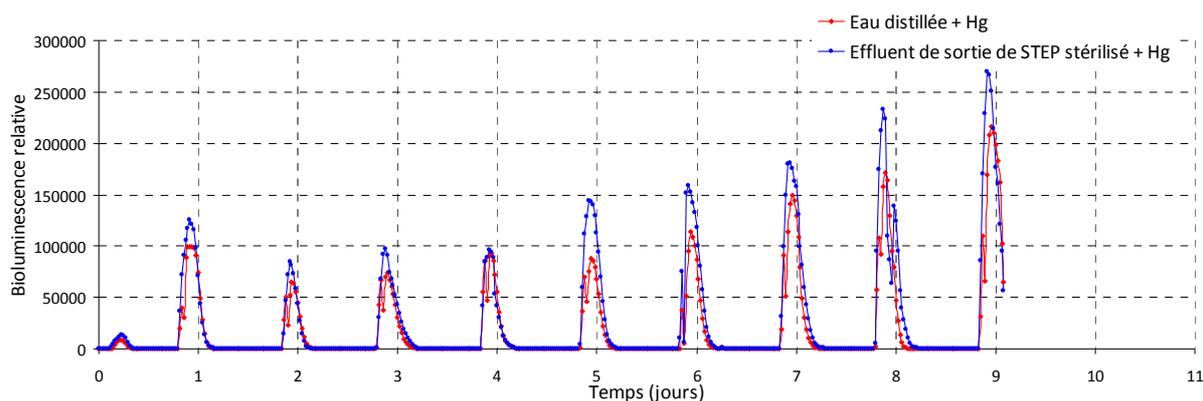
## 5.2. Utilisation du biocapteur *Lumisens III* en conditions environnementales

### 5.2.1. Influence des conditions environnementales sur la détection

L'objectif de cette phase de l'étude était d'évaluer l'impact d'une matrice environnementale (eau de sortie de station d'épuration) sur la détection du mercure par le biocapteur *Lumisens III*. Afin de mieux caractériser l'influence de cette matrice sur la détection, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la matrice stérilisée (pas d'influence de la microflore environnementale) puis dans un second temps à la matrice brute (non stérilisée).

#### 5.2.1.1. Cas d'une eau de sortie de station d'épuration préalablement stérilisée

Pour cette étude, l'eau distillée utilisée dans le milieu acétate dilué au 1/10 contenant le métal (mercure à 500nM) a été substituée par de l'eau de l'environnement stérile : eau de sortie de la station d'épuration de Moulin Grimaud (50000 Equivalent habitants, 85000 La Roche sur Yon) stérilisée par autoclave à 120°C durant 20 minutes. D'après les données recueillies (Figure 50), cette matrice abiotique ne semble pas générer de perturbation significative au niveau de l'induction de la bioluminescence de la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux. En effet, les deux profils d'induction obtenus à partir de la matrice de laboratoire (eau distillée) et la matrice environnementale (eau de sortie de station d'épuration stérile) sont quasiment superposables durant les phases de stabilisation et de stabilité (du jour 0 au jour 4). Cependant, il semblerait que la matrice environnementale favorise l'apparition du biofilm : la bioluminescence augmente dès le jour 5.



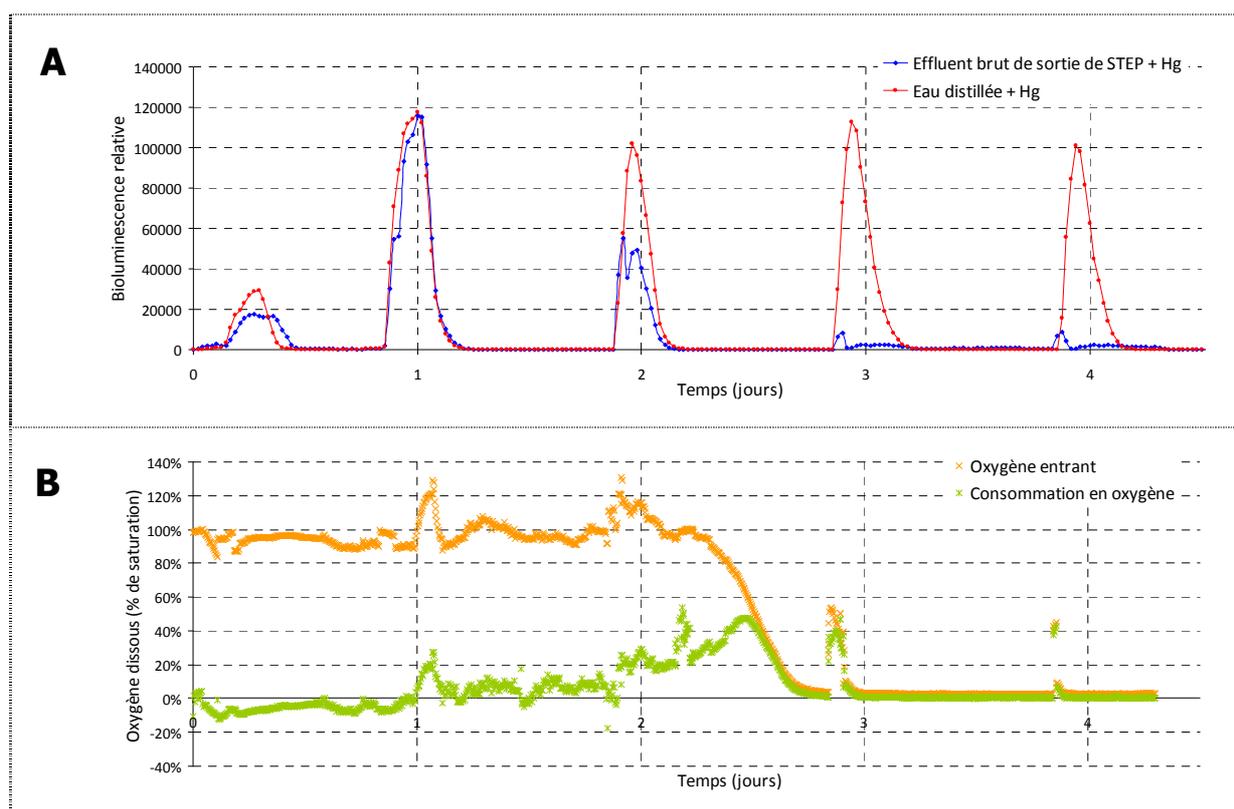
**FIGURE 50 :** INFLUENCE D'UNE MATRICE ENVIRONNEMENTALE STERILE SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE CHEZ *E. COLI* K12 MG1655 pBMERLUX.

Conditions expérimentales : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50µg/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de mercure durant 100 minutes (matrices : eau distillée pour le témoin et eau de sortie de station d'épuration stérile pour l'essai). La bioluminescence est mesurée par une caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute).

## 5.2.1.2. Cas d'une eau de sortie de station d'épuration non stérilisée

Comme cela a été démontré précédemment, les bactéries immobilisées sont en constante évolution dans le biocapteur (phase de stabilisation, phase de stabilité et apparition du biofilm). Aussi, il est important de maîtriser cette évolution au maximum afin d'obtenir de bon niveau de reproductibilité. L'objet de cette étude est donc d'évaluer l'impact de la flore microbienne de l'environnement sur l'évolution du signal d'induction. Pour cela, comme dans le paragraphe précédant, la matrice « eau distillée » contenant le métal a été remplacée par une eau prélevée en sortie de station d'épuration (identique à la précédente) mais non stérilisée.

Dans le cas de la matrice « Eau de l'environnement », les niveaux d'induction sont comparables au jour 0 et au jour 1 avec les niveaux mesurés avec la matrice « Eau distillée ». Par conséquent, la flore microbienne environnementale ne semble pas perturber l'induction de la bioluminescence de la souche *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux durant cette période. Au delà, les niveaux de bioluminescence mesurés diminuent jusqu'à inhibition totale de l'induction de la bioluminescence (Figure 51-A).



**FIGURE 51 :** INFLUENCE DES PARAMETRES BIOLOGIQUES D'UNE MATRIxE ENVIRONNEMENTALE SUR L'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE CHEZ *E. COLI* K12 MG1655 pBMERLUX.

Conditions expérimentales : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de mercure durant 100 minutes (matrices : eau distillée pour le témoin et eau de sortie de station d'épuration non-stérile pour l'essai). La bioluminescence est mesurée par une caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute).

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la quantité d'oxygène entrant et consommée par les bactéries au niveau du support d'immobilisation (Figure 51-B). Ces données montrent une corrélation entre l'inhibition du signal de bioluminescence et la disparition de l'oxygène entrant. En effet, l'absence d'oxygène, substrat nécessaire à la réaction de bioluminescence bactérienne, est probablement la cause principale de l'inhibition de la bioluminescence. Cependant, cette absence peut s'expliquer par une forte colonisation des canalisations en amont de la carte de mesure par des micro-organismes apportés dans l'échantillon environnemental non stérile.

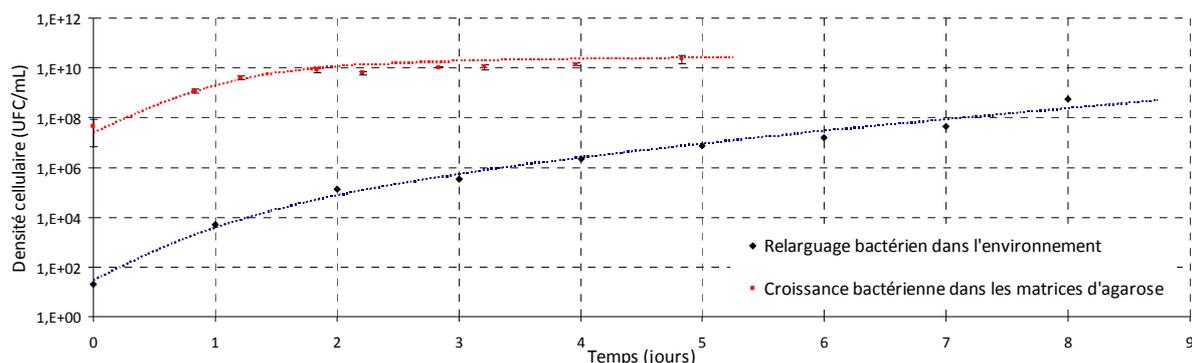
Outre la disparition de l'oxygène lié à des contaminations environnementales, d'autres phénomènes peuvent jouer un rôle dans l'inhibition observée du signal de bioluminescence :

- concurrence pour le substrat entre bactéries de l'environnement et bactéries immobilisées pouvant engendrer une carence nutritive ne permettant plus aux bactéries immobilisées de synthétiser l'ensemble des éléments nécessaires à la bioluminescence (FMNH<sub>2</sub>, luciférase, aldéhyde à longue chaîne) voir une mortalité des bactéries immobilisées.
- lyse de cellules bactériennes immobilisées par des bactériophages
- altération de la population bactérienne originale engendrée par des protozoaires.

D'autre part, on note une certaine corrélation entre les résultats antérieurs (figure 46-C) et les résultats observés dans le cas d'une matrice non stérile : augmentation de l'intensité du signal durant les 30 premières heures suivi par une baisse significative de la bioluminescence mesurée jusqu'à la disparition totale du signal de bioluminescence. Par conséquent, il semblerait que les résultats observés sur la figure 46-C soient la conséquence d'une contamination biologique du système.

### **5.2.2. Risques liés à l'utilisation du biocapteur *Lumisens III* sur l'environnement.**

Outre les limites évoquées précédemment (stabilité dans le temps, contraintes d'utilisation dans l'environnement), un problème a été soulevé quant à la mobilité des bactéries dans le biocapteur (cf. paragraphe 5.1.1.1.). Le risque est de contaminer l'environnement par des bactéries modifiées (transfert de gènes, résistance aux antibiotiques) issue d'un relargage. Afin d'évaluer ce critère, nous avons réalisé un dénombrement bactérien en sortie du biocapteur *Lumisens III* à différents temps, les données obtenus sont reprises sur la figure 52.



**FIGURE 52 :** EVALUATION DU RELARGAGE BACTERIEN DANS LE BIOCAPTEUR LUMISENS III.

Conditions expérimentales du biocapteur Lumisens III : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de mercure durant 100 minutes (matrice : eau distillée).

Conditions expérimentales du dénombrement : Dénombrement selon la méthode des Unités Formant Colonies (UFC) sur milieu acétate gélosé (AcG 1X) contenant 100 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Durée d'incubation : 48 h à 30°C.

Les résultats permettent de mettre en évidence la présence de bactéries modifiées en sortie du biocapteur (culture sur gélose contenant un antibiotique) et cela dès la mise en œuvre du système (jour 0 : environ 20 UFC/ml). De plus, le relargage bactérien s'accroît avec le temps de manière exponentielle jusqu'à atteindre des niveaux de contamination de l'ordre de  $5.10^8$  UFC/ml au jour 8.

### 5.3. Conclusion

Les résultats obtenus dans cette phase de l'étude, ont permis, d'une part, d'établir les limites du système et, d'autre part, de mettre en évidence les risques environnementaux liés à son utilisation.

Les travaux réalisés en conditions de laboratoire ont permis de déterminer une période d'utilisation du système actuel comprise entre 3 et 4 jours (période de stabilité). Cependant, cette période n'est accessible qu'après un délai de stabilisation du biosystème de 3 jours (période de stabilisation). De plus, au vu des temps de régénération de 6 à 10 heures en fonction de l'intensité du pic de bioluminescence (période entre l'arrêt de l'exposition au polluant et le retour au niveau basal de bioluminescence), le système est en mesure de réaliser quotidiennement jusqu'à trois analyses maximum (un cycle = 1 heure d'induction + 6 heures minimum de régénération). En conditions environnementales non-stériles, le biocapteur Lumisens III n'est plus un outil pertinent. En effet, l'introduction d'une microflore environnementale dans le système entraîne de fortes perturbations biologiques jusqu'à inhibition totale de l'induction de la bioluminescence des bactéries immobilisées en matrice d'agarose. Il est cependant envisageable de lever ce verrou technologique par ajout d'un système de stérilisation (filtration, stérilisation thermique, Ultra-violet,...) des effluents en entrée du biocapteur au risque de dénaturer l'échantillon initial.

Cette étude a également relevé un niveau significatif de contamination de l'environnement par relargage de bactéries immobilisées, associé au risque de transfert de gènes entre bactéries modifiées et bactéries environnementales (gènes de résistance aux antibiotiques). Pour palier à cette contamination, il est possible de stériliser ou de stocker les échantillons de sortie (soit environ 3 litres par jour et par souche bactérienne).

Pour conclure, ce système apparaît comme un outil inadaptée dans le cadre initialement prévu, à savoir le suivi de pollution par bactéries bioluminescentes. En effet, les limites biologiques du système (contamination environnementale, maintien du métabolisme des bactéries) impliquent de nombreuses contraintes technologiques (préparation et stérilisation en amont et en aval des milieux de circulation, récupération, traitement et stockage des milieux utilisés) pour un outil finalement présentant une période d'analyse limitée à 3-4 jours avec au maximum 3 expositions quotidiennes.

Partant de ce constat, nous proposons de développer un nouvel outil d'analyse afin de palier aux limites actuelles des biocapteurs bactériens : Lumisens IV.

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »*

[Albert Einstein]

## **Chapitre 6 : Développement d'un système hybride biocapteur/bioessai pour le suivi de pollution métallique**

---

Ce nouveau « bio-système » est à la frontière des biocapteurs et des bio-essais. Il a été conçu pour répondre à la problématique de la détection et de la quantification de polluant (métaux) dans l'environnement en s'attachant plus particulièrement à la fiabilité des informations fournies dans le cadre du suivi de pollution sur le long terme. Comme ses prédécesseurs (Lumisens I, II, et III), ce système repose sur des bactéries bioluminescentes inductibles ou constitutives. Cependant, les bioéléments ne sont pas maintenus actifs comme dans les biocapteurs Lumisens I (phase liquide), Lumisens II (phase immobilisée) et Lumisens III (phase immobilisée) mais dans un état stable de conservation par lyophilisation en microplaque commerciale.

## 6.1. Ingénierie du biosystème : Lumisens IV

L'objectif de ce nouveau système est non pas de faire de l'analyse en continu mais plutôt de l'analyse séquentielle. Dans ce cas, chaque analyse est associée à une phase de ré-activation des bactéries lyophilisées avant exposition à l'échantillon testé et après analyse, les bactéries ne sont plus réutilisées.

### 6.1.1. Conception assisté par ordinateur

L'utilisation de capteurs biologiques pour la détection de polluant ainsi que le type de signal biologique produit par ces capteurs engendrent un certain nombre de contraintes quant à la réalisation de l'automate de mesure. De plus, la forme sous laquelle sont conservées les bactéries (lyophilisées) implique également une étape indispensable de réhydratation préalable à la mesure. Un autre élément est à prendre en compte : afin de limiter les risques de réhydratation des bactéries lyophilisées, les microplaques ont été scellées hermétiquement par un film auto-collant étanche à l'humidité. L'ensemble de ces éléments ont été pris en compte lors de l'étape de conception du biosystème Lumisens IV à l'aide de logiciel de CAO : Solid Edge<sup>®</sup> (étape réalisée par nos soins).

#### 6.1.1.1. Circulation des fluides

L'ensemble du système de circulation des liquides (eau distillée destinée à la réhydratation des bactéries et échantillons analysés) s'articule autour de l'automate de micro-injection dédié au remplissage de microplaque : Micro10x (Hudson Robotics Inc. <sup>©</sup>, USA). Entièrement contrôlé par ordinateur, cet automate permet d'une part, la distribution simultanée de micro-volumes (100µl ou 25µl) dans les 8 puits des colonnes de la microplaque contenant les bactéries lyophilisées mais il permet également de percer le film aluminium utilisé pour sceller ces microplaques.

**FIGURE 53 :** PHOTOGRAPHIE DE L'AUTOMATE DE MICRO-DISTRIBUTION : MICRO10X (ICI EN CONFORMATION AVEC 12 INJECTEURS POUR UNE DISTRIBUTION EN LIGNE).



L'utilisation de bactérie lyophilisée implique, comme vu précédemment, une étape indispensable de réhydratation avec de l'eau distillée (100µl). Aussi, ce système étant mono-canal, il était fondamental d'intégrer, en amont de cet automate, une électrovanne capable de modifier le type d'échantillon à injecter (eau distillée ou échantillon à analyser). Enfin, un système optionnel de pompage a été incorporé dans le biocapteur Lumisens IV afin de permettre, si besoin, de faire circuler certains liquides (cas d'une canalisation). Le schéma du circuit de circulation des fluides est repris sur la figure 54.

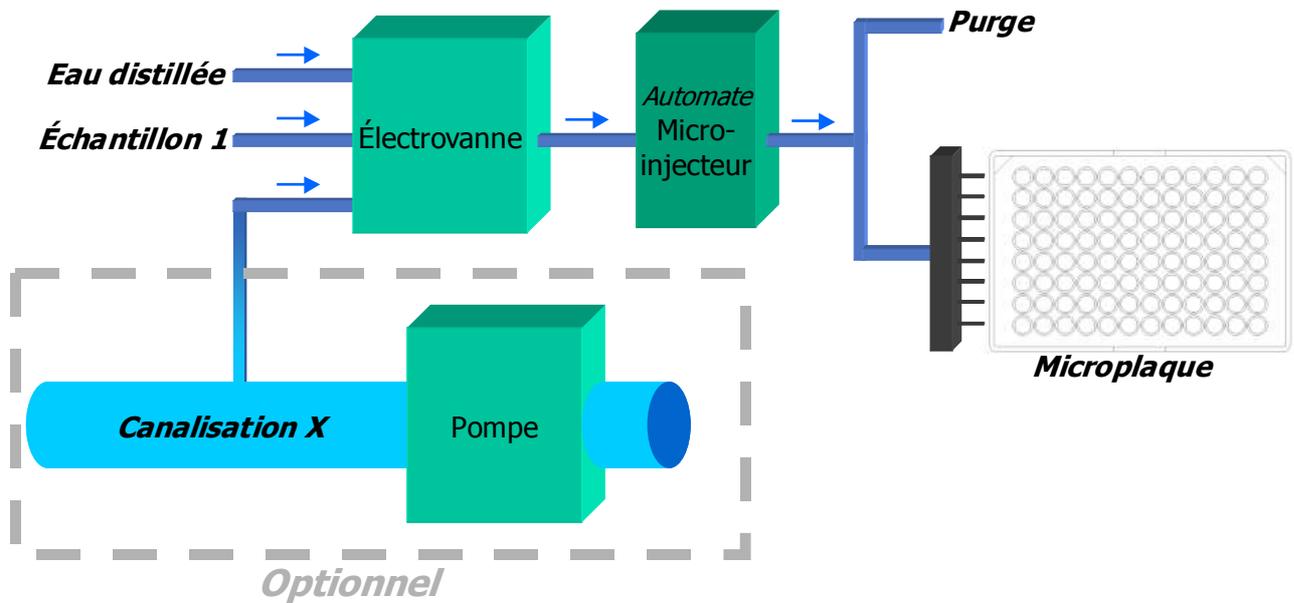


FIGURE 54 : CIRCUIT FLUIDIQUE MIS EN ŒUVRE DANS LE BIOCAPTEUR LUMISENS IV.

En bleu : canalisation permettant la circulation des liquides

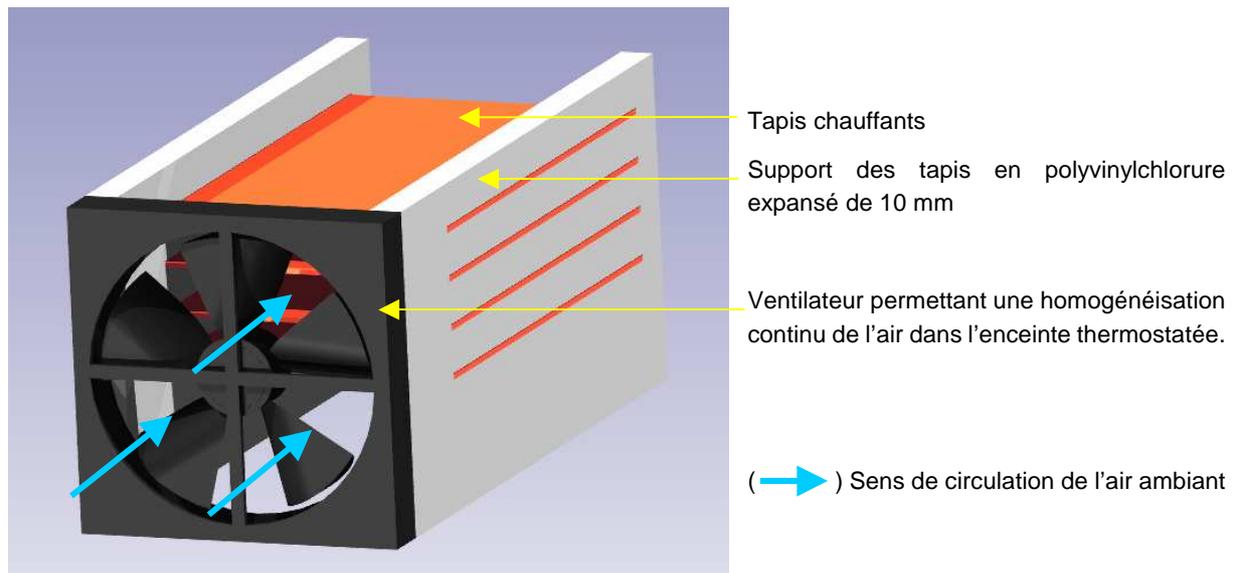
#### 6.1.1.2. Chambre de mesure

La mesure de la bioluminescence bactérienne implique un système de capture limitant au maximum les contaminations lumineuses environnementales. De plus, afin de respecter les conditions d'analyse, l'enceinte de mesure doit également rester à une température constante de 30°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

- Enceinte thermostatée et étanche à la lumière extérieure

Afin de faciliter la régulation thermique, l'ensemble des parois de l'enceinte de mesure sont composées de deux plaques de 4 mm en polyvinylchlorure expansé (Forex<sup>®</sup>) séparées par une couche de laine thermo-isolante Superwool 607<sup>™</sup>. L'objectif de ce type de paroi est de limiter les échanges de chaleur entre l'intérieur et l'extérieur de l'enceinte. En plus de l'isolation avec l'extérieur, un système de chauffage a été intégré dans l'enceinte afin d'apporter la chaleur manquante. Ce système de régulation thermique a été conçu pour chauffer de manière homogène l'ensemble de l'enceinte de mesure tout en limitant le phénomène d'inertie thermique autrement dit la libération de l'énergie emmagasinée par le système de chauffage lui-même malgré l'arrêt de l'alimentation électrique du système de chauffage. Les tapis chauffants nous semblaient être des systèmes intéressants pour répondre aux besoins du

biocapteur Lumisens IV. Une modélisation en 3 dimensions du système de chauffage est présentée sur la figure 55.



**FIGURE 55 :** MODELISATION EN 3 DIMENSIONS DU SYSTEME DE CHAUFFAGE INTERNE A LUMISENS IV.

Ce système est régulé à l'aide d'une sonde thermique de type Pt100 située à hauteur de la microplaque et d'un régulateur de température (di eco, JUMO).

Ce biocapteur étant prévu pour une utilisation dans un environnement dont la température ambiante est inférieure à 25°C, il n'était pas nécessaire d'intégrer un système de refroidissement dans la chambre de mesure.

L'étanchéité à la lumière est garantie par le choix des matériaux utilisés pour la conception du système Lumisens IV. En effet, le polyvinylchlorure expansé (épaisseur de 4mm, noir, Forex<sup>®</sup>) utilisé pour les parois est un matériau qui bloque les rayons lumineux.

- Système de capture de bioluminescence bactérienne

Pour ce biosystème, la capture de la bioluminescence est réalisée, comme pour Lumisens III, par caméra CCD. Ce choix réside dans sa simplicité d'utilisation et d'installation. Ce moyen de capture permet également d'obtenir une vue globale de l'ensemble des bactéries bioluminescentes simultanément. Deux possibilités en terme de conformation de capture étaient possibles :

- soit la camera CCD est placée au dessus de la microplaque. Cette conformation implique que le film hermétique qui scelle la microplaque soit transparent afin de ne pas perturber la capture de la bioluminescence.
- soit la caméra est située en dessous de la microplaque. Avec cette configuration de capture, le fond des puits de la microplaque doit être transparent.

Pour des raisons de géométrie de capture, la configuration avec la camera au dessus de la microplaque a été abandonnée au profit de la seconde configuration (Figure 56). En effet, dans le cas de la première configuration, la profondeur des puits de la microplaque gêne la

mesure : les parois de ces derniers soustraient les bactéries bioluminescentes du champ de capture de la caméra.

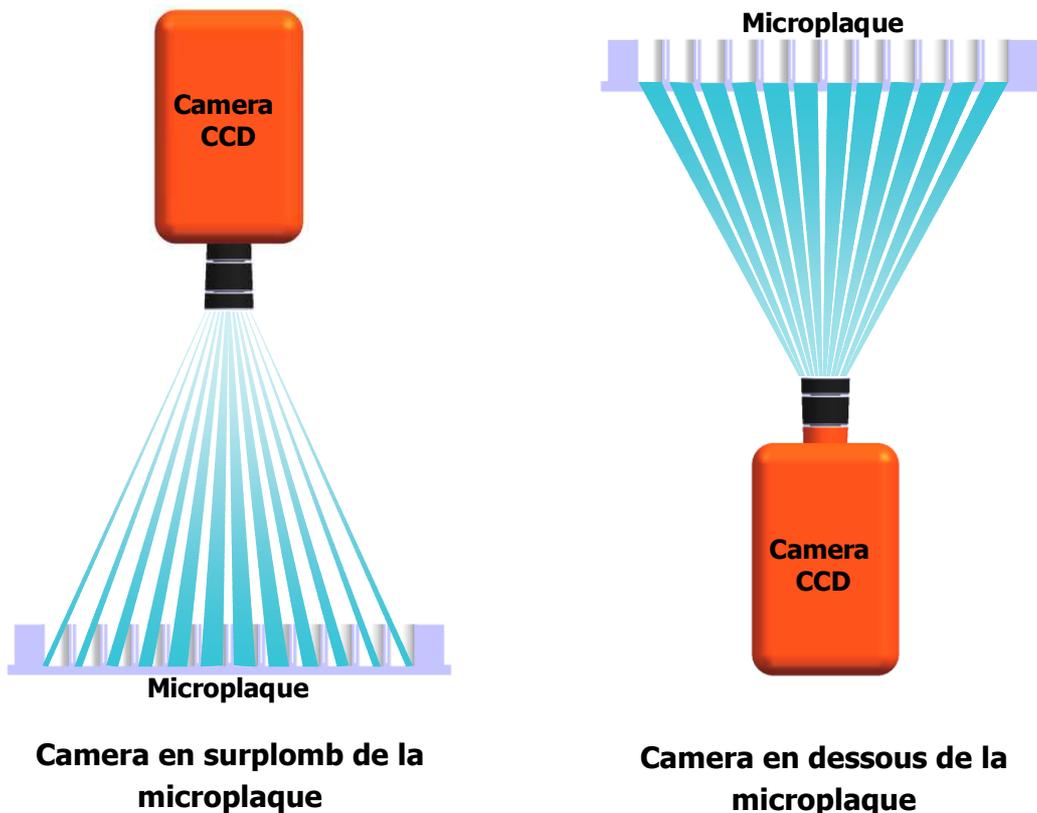


FIGURE 56 : CONFIGURATION DE CAPTURE DE LA BIOLUMINESCENCE PAR LA CAMERA CCD.

- Organisation générale de la chambre de mesure

Le schéma ci-dessous (figure 57) montre l'agencement des différents éléments de Lumisens IV au sein de la chambre noire thermostatée consacrée à la mesure de la bioluminescence des bactéries lyophilisées en microplaques.

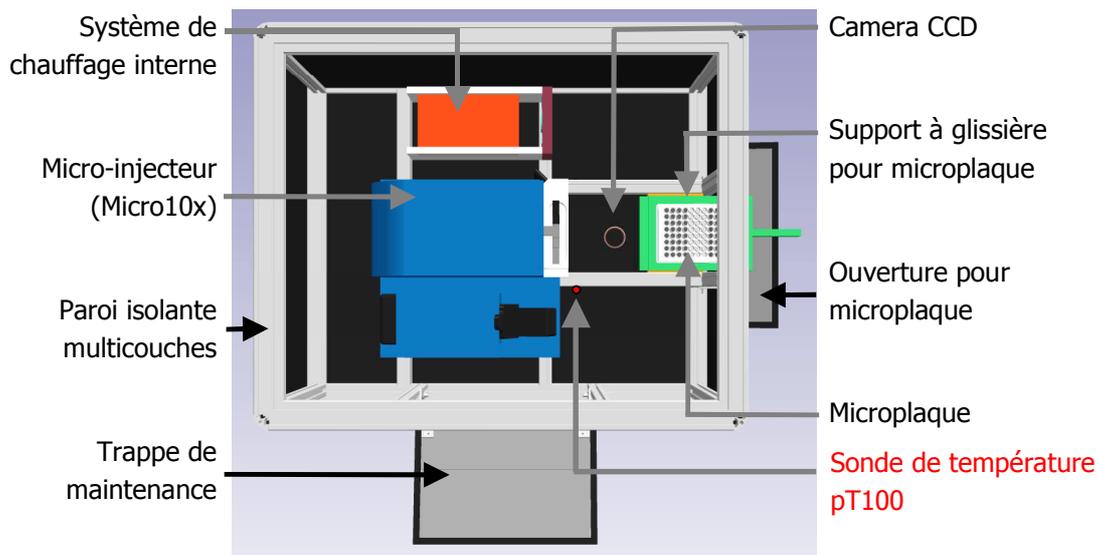


FIGURE 57 : ORGANISATION (VUE DE DESSUS) DE LA CHAMBRE DE MESURE DE LA BIOLUMINESCENCE.

### 6.1.1.3. Vue d'ensemble du biocapteur Lumisens IV avant l'étape de construction

Afin de faciliter la construction du biocapteur Lumisens IV, nous avons développé l'ensemble du système sur logiciel de CAO (Solid Edge®). Cette étape préalable, incluant la réalisation des plans, la cotation et le choix des différents matériaux qui compose le système, qui a nécessité près de deux mois de travail, a permis un gain de temps très important lors de l'étape suivante de construction. Le biocapteur Lumisens IV (figure 58) est composé de trois compartiments distincts : la chambre de mesure, un compartiment dédié à la circulation des liquides (en bas à gauche) et un compartiment destiné au contrôle du biocapteur (en bas à droite).

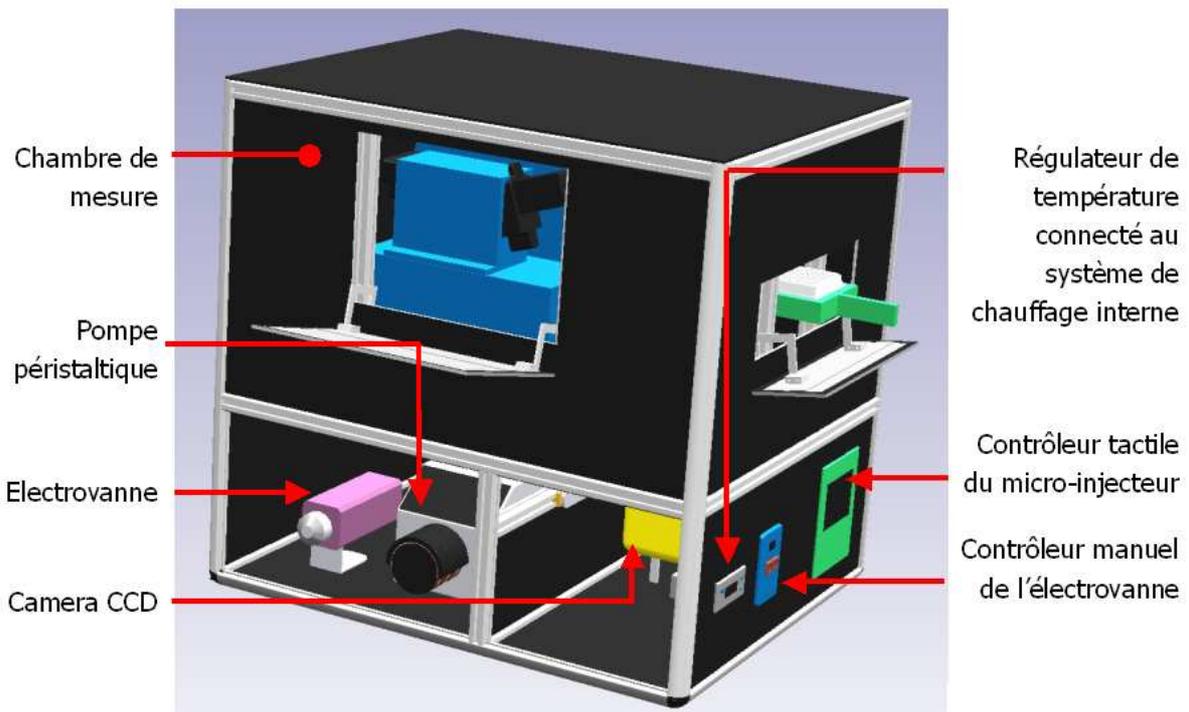


FIGURE 58 : VUE D'ENSEMBLE DU MODELE 3D DE LUMISENS IV PREALABLE A LA CONSTRUCTION

### 6.1.2. Construction du nouveau système

L'étape de construction a duré environ trois mois avec la collaboration de B.Vrignaud de l'IUT de la Roche sur Yon. La difficulté majeure rencontrée lors de la construction du biocapteur a été le respect des contraintes imposées par la chambre de mesure en terme de contaminations lumineuses. Aussi, afin de réduire au maximum ces perturbations, un certain nombre de précautions techniques et technologiques ont été prises (choix des matériaux, procédure de fabrication...).

Quelques photographies résumant les différentes étapes de la construction sont reprises dans la figure 59.



**FIGURE 59 :** PHOTOGRAPHIES DE QUELQUES ETAPES DE LA CONSTRUCTION DE LUMISENS IV.

Quelques modifications ont été apportées par rapport au plan initial du biocapteur. La principale concerne l'ajout d'un compartiment supplémentaire en dessous de la chambre de mesure dédiée à l'ensemble des branchements électriques et électroniques. On retrouve un

port USB permettant de commander informatiquement l'électrovanne et le micro-injecteur Micro10x ainsi qu'un port firewire IEEE 1394 dédié à la camera CCD.

## **6.2. Procédure d'utilisation de Lumisens IV**

### **6.2.1. Séquence d'exposition**

L'utilisation de bactéries lyophilisées dans ce biocapteur implique obligatoirement une étape préalable de réhydratation (100µl d'eau distillée par puits) des cellules avant analyse. La période de réhydratation effectuée (30 minutes), l'analyse démarre par ajout de 25µl d'échantillon à analyser (cf. paragraphe 2.9.2.). La mesure de la bioluminescence est réalisée après 1 heure de contact bactéries/échantillon.

Afin de caractériser ce nouveau biocapteur, une séquence a été établie afin de se rapprocher au plus près des conditions environnementales ; l'enjeu étant de vérifier la fiabilité du système en conditions environnementales et dans le temps. Pour cela, nous avons reproduit les conditions d'essai mises en œuvre lors de l'étude réalisée avec le biocapteur Lumisens III (bactéries immobilisées dans une matrice d'agarose).

### **6.2.2. Traitement des données**

La mesure de bioluminescence est réalisée de manière similaire au biocapteur Lumisens III. En effet, les données sont tout d'abord captées par la caméra CCD sous la forme d'image photographique monochromatique. Ces images sont dans un second temps, traitées informatiquement afin de quantifier l'intensité lumineuse émise par les bactéries (cf. paragraphe 2.1.6.).

## **6.3. Caractérisation du biocapteur Lumisens IV**

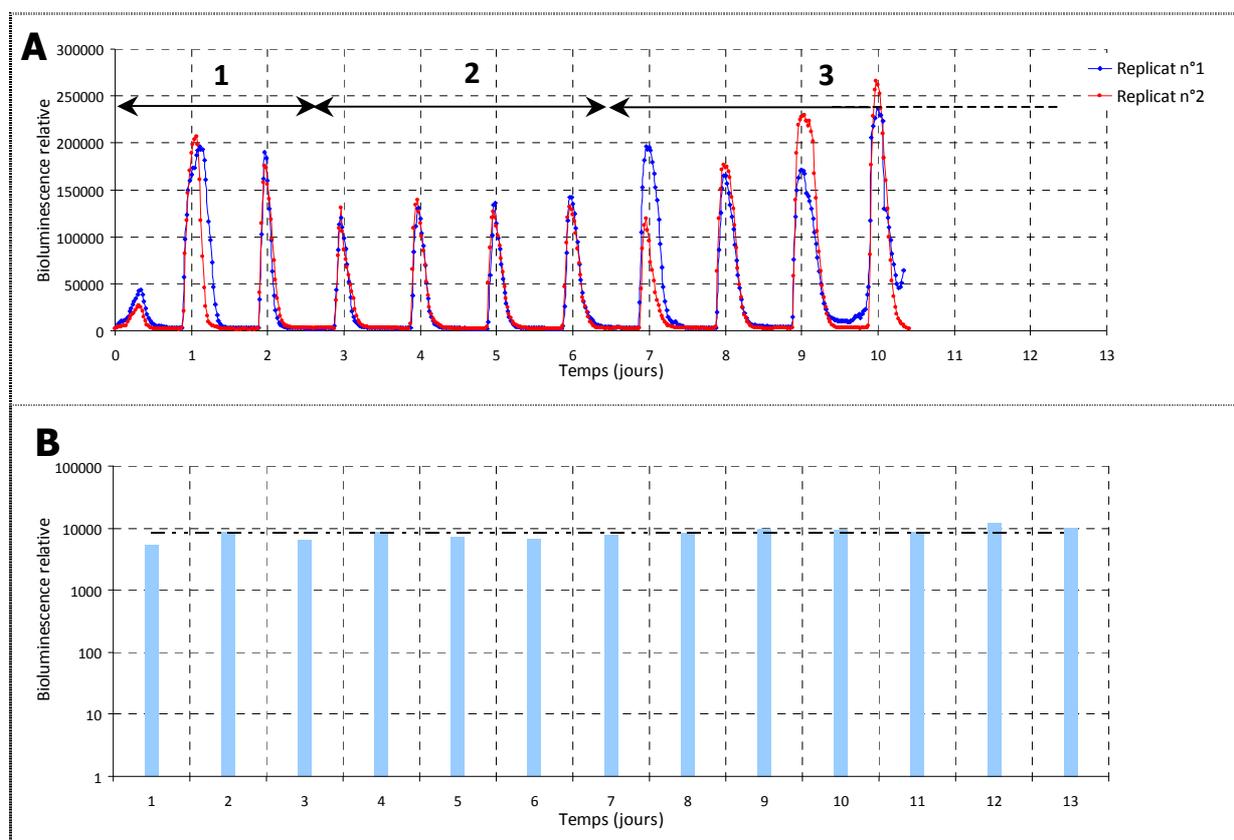
Ce nouveau système présente de nombreux avantages par rapports à son prédécesseur Lumisens III. Son mode de mesure séquentiel basé sur des bactéries lyophilisées en microplaque supprime la question de la régénération des bioéléments (les bactéries ne sont plus réutilisées après analyse). De plus, avec ce nouveau système, l'eau de l'environnement étant prélevée avant d'être injectée dans les puits de la microplaques, il n'y a plus aucun relargage bactérien dans l'environnement.

### **6.3.1. Stabilité du système dans le temps (conditions de laboratoire)**

Le premier point de caractérisation abordé vise à étudier la stabilité du signal d'induction obtenu avec ce nouveau biosystème, en conditions maîtrisées de laboratoire. Pour cela, les conditions expérimentales suivies lors de la caractérisation de Lumisens III (cf. paragraphe 5.1.1.1.) ont été adaptées à ce nouveau système (tableau 22) afin de se rapprocher des conditions fixées lors des expériences en bioessai (cf. paragraphe 2.9.2.). Les résultats obtenus avec les biocapteurs Lumisens III et Lumisens IV apparaissent, respectivement, sur les figures 60-A et 60-B.

**TABLEAU 22 :** CONDITIONS EXPERIMENTALES MISES EN OEUVRE DANS LA CARACTERISATION DE LUMISENS III ET IV

Paramètres	Lumisens III	Lumisens IV
Souches bactériennes	<i>E.coli</i> K12 MG1655 pBMerlux	
Métal testé	Mercure	
Concentration	500nM	
Température d'analyse	20°C	30°C
Durée d'exposition	110 minutes	60 minutes
Mesure de la bioluminescence	Caméra CCD	Caméra CCD
	Temps d'intégration : 1min	Temps d'intégration : 1min



**FIGURE 60 :** NIVEAU D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE *E. COLI* K12 MG1655 PBMERLUX OBSERVE DANS LUMISENS III ET IV : CAS D'UNE EXPOSITION QUOTIDIENNE AU MERCURE.

A : Conditions expérimentales pour Lumisens III: Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de mercure durant 100 minutes. Système placé dans une chambre thermostatée à 20°C. **1** : phase d'équilibration biologique (croissance bactérienne) ; **2** : phase de stabilité ; **3** : Apparition du biofilm et perturbation de la mesure de bioluminescence. Mesure de la bioluminescence par caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute)

B : Conditions expérimentales pour Lumisens IV : Bactéries lyophilisées en microplaque (densité cellulaire :  $A_{620nm}=0,075$ ). Réhydratation des bactéries avec 100 $\mu$ l d'eau distillée par puits durant 30 minutes à 30°C puis injection de 25 $\mu$ l d'échantillon contaminé (mercure à 500nM). Incubation de 60 minutes à 30°C avant lecture. Mesure de la bioluminescence par caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute). Le bruit de fond a été soustrait à la valeur de bioluminescence brute.

Contrairement au biocapteur Lumisens III, ce nouveau système ne présente ni phase d'équilibration ni phase de perturbation du signal durant l'ensemble de la période d'analyse (13 jours). Cette absence est directement liée au mode de conservation des bactéries dans le système. En effet, sous forme lyophilisée, les bactéries sont figées dans le temps et la reprise de l'activité cellulaire des bactéries intervient uniquement lors de la réhydratation.

Avec ce nouveau système, la mesure reste relativement stable dans le temps : le taux de variation observé avoisine les 20% contre seulement 5% pour le biocapteur Lumisens III durant la période de stabilité (et 40% pour l'ensemble de la période d'analyse). Ce taux de variation peut être attribuable d'une part, à la diversité biologique (environ 15%) et d'autre part, aux caractéristiques techniques intrinsèques à ce nouveau biosystème (contaminations lumineuses non négligeables : 5%). Nous verrons plus tard que ces 20% de variation n'ont pas d'influence significative sur l'interprétation des données par le logiciel « Metalsoft » (cf. paragraphe 6.4.2.).

Ainsi, grâce au mode d'analyse de Lumisens IV, le temps n'apparaît plus comme un facteur limitant contrairement au système précédent Lumisens III.

### **6.3.2. Stabilité du système dans le temps (en conditions environnementales)**

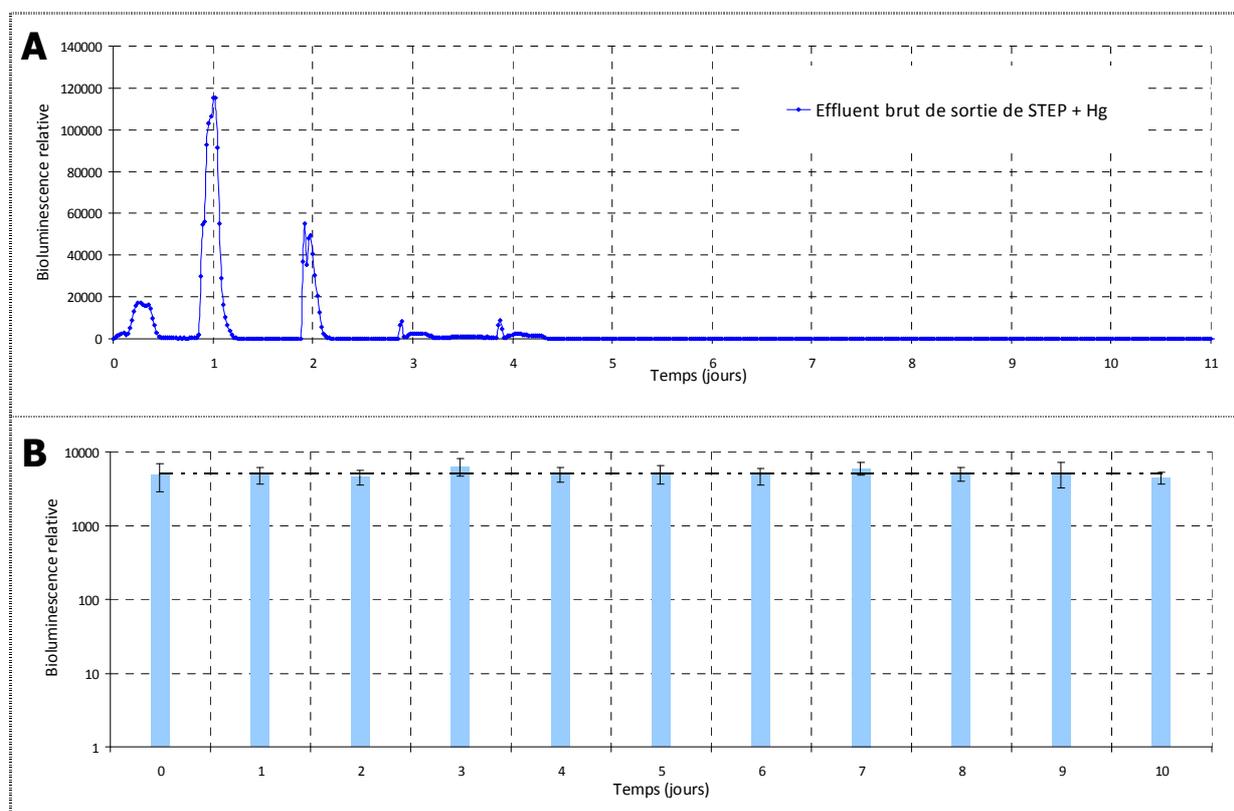
En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'influence d'une matrice environnementale non stérile (eau de sortie de station d'épuration détaillée dans le paragraphe 4.5.) sur la stabilité du signal de bioluminescence généré par l'induction des bactéries. Les conditions d'étude sont semblables à celles mises en œuvre dans le paragraphe précédent (tableau 22). Les résultats obtenus avec Lumisens III et Lumisens IV sont présentés, respectivement sur les figures 61-A et 61-B.

Contrairement au biocapteur Lumisens III où on observait une disparition du signal de bioluminescence au delà du second jour d'analyse, le niveau de bioluminescence mesurée reste relativement stable : taux de variation proche de 25% (pas d'influence sur l'interprétation des données par « Metalsoft », cf. 6.2.). Cette différence importante entre les deux systèmes est liée directement au mode de mesure. Dans Lumisens IV, les bactéries sont compartimentées dans les puits des microplaques permettant ainsi à chaque analyse d'être indépendante alors que Lumisens III, les bactéries peuvent être plus ou moins influencées par les expositions antérieures : toxicité chimique ou biologique (bactériophages, protozoaires,...), compétition pour le substrat (microflore environnementale)...

Les niveaux d'induction de la bioluminescence observés avec cette matrice environnementale sont moins importants qu'avec la matrice de laboratoire (eau distillée contenant du mercure à 500nM). Après analyse chimique du mercure réalisée par le laboratoire départemental d'analyse, il apparaît qu'une fraction importante du mercure ajouté soit adsorbée sur les matières en suspension (60%). En effet, après filtration sur membrane de porosité 0,45µM (piège les matières en suspension), la concentration en mercure chute de 500nM (échantillon non filtré) à 192nM (échantillon filtré). Une fraction du mercure étant adsorbée (60%) sur les

matières en suspension, il y a moins de métal bio-disponible pour l'induction des bactéries pouvant expliquer le plus faible niveau de signal émis.

Malgré cela, ce nouveau système permet de s'affranchir des problèmes environnementaux liées aux micro-organismes présents dans l'environnement tout en conservant un signal de bioluminescence stable dans la durée.



**FIGURE 61 :** NIVEAU D'INDUCTION DE LA BIOLUMINESCENCE DE *E. COLI* K12 MG1655 pBMerLUX OBSERVE DANS LUMISENS III ET IV : CAS D'UNE EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE QUOTIDIENNE AU MERCURE.

A : Conditions expérimentales pour Lumisens III : Bactéries immobilisées dans une matrice solide d'agarose à 2% (densité cellulaire initiale :  $A_{620nm} = 0,1$ ). Milieu de circulation : milieu acétate dilué au dixième (Ac1/10) complété de 50 $\mu$ g/ml d'ampicilline. Expositions quotidiennes à 500nM de mercure durant 100 minutes (matrice : eau de sortie de station d'épuration non-stérile). Mesure de la bioluminescence par caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute)

B : Conditions expérimentales pour Lumisens IV : Bactéries lyophilisées en microplaque (densité cellulaire :  $A_{620nm}=0,075$ ). Réhydratation des bactéries avec 100 $\mu$ l d'eau distillée par puits durant 30 minutes à 30°C puis injection de 25 $\mu$ l d'échantillon contaminée (mercure à 500nM, matrice : eau de sortie de station d'épuration non-stérile). Incubation de 60 minutes à 30°C avant lecture. Mesure de la bioluminescence par caméra CCD (temps d'intégration = 1 minute). Le bruit de fond a été soustrait à la valeur de bioluminescence brute. Les écarts-types ont été calculés à partir de plusieurs expériences réalisés dans la même journée (n=8).

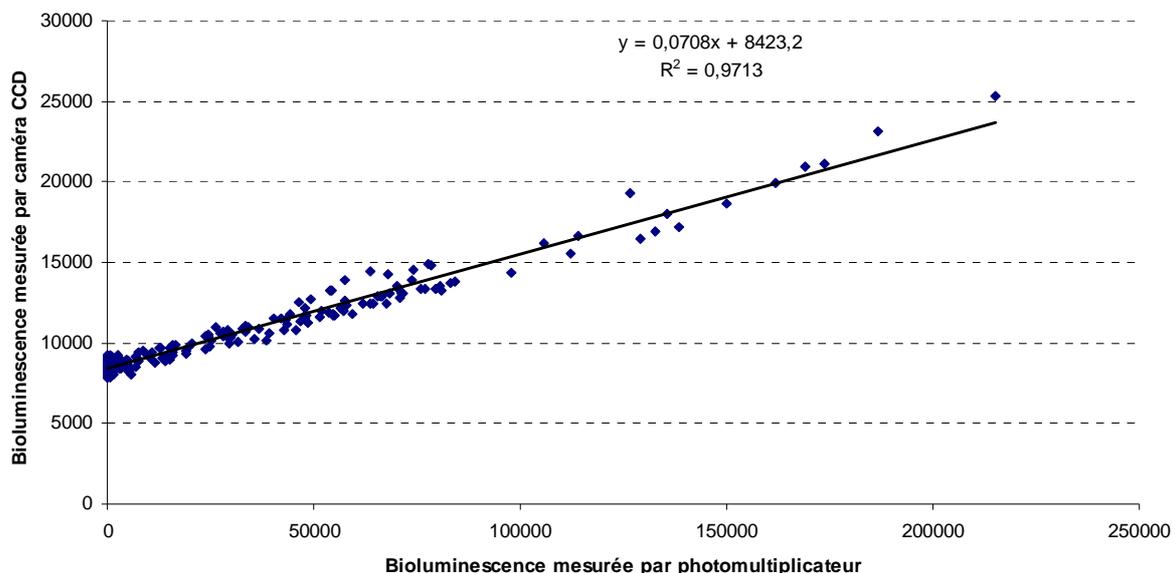
#### 6.4. Suivi de pollution à l'aide du biosystème Lumisens IV couplé au module d'analyse des données du logiciel Metalsoft.

Afin de proposer un système complet d'analyse des pollutions métalliques de l'eau, le biocapteur Lumisens IV a été couplé au système de traitement informatique « Metalsoft » (cf. paragraphe 4.4.2.). Toutefois, l'analyse des données du biocapteur par ce logiciel implique une phase d'ajustement des données de bioluminescence liée à la différence de capteur photosensible utilisé. En effet, le mode de mesure de la bioluminescence du biocapteur Lumisens IV repose sur une caméra CCD alors que le logiciel « Metalsoft » a été développé à partir d'une matrice de données mesurées par photomultiplicateur.

##### 6.4.1. Calibration du système

Pour utiliser Metalsoft sur les données recueillies avec le biocapteur Lumisens IV, une étape de calibration a été nécessaire. En effet, le jeu de données utilisées pour concevoir les arbres de décision inclus dans Metalsoft repose sur des essais réalisés en microplaque avec des bactéries lyophilisées mais dont la bioluminescence était mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur à la différence du biocapteur Lumisens IV où la bioluminescence est mesurée par caméra CCD. D'une méthode à l'autre, les valeurs de bioluminescence varient en raison de sensibilité différente entre les systèmes de mesure et/ou de bruit de fond propre aux systèmes (contamination lumineuse).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée afin d'établir la relation entre les données mesurées avec le photomultiplicateur et celles obtenues avec la caméra CCD de Lumisens IV. La courbe d'étalonnage est présentée sur le graphique suivant (Figure 62).



**FIGURE 62 :** COURBE D'ETALONNAGE ENTRE LES DEUX TRANSDUCTEURS PHOTOSENSIBLES UTILISES (PHOTOMULTIPLICATEUR ET CAMERA CCD)

La bioluminescence a été mesurée à partir de bactéries contenues dans une microplaque.

Ainsi, à partir de cette courbe étalon, les données de bioluminescence mesurées par la caméra CCD de Lumisens IV ont été converties en données exploitables par le logiciel « Metalsoft » suivant la fonction suivante :

$$BL_{eq} = \frac{BL_{CCD} - 8423,2}{0,0708}$$

$BL_{eq}$  : Bioluminescence équivalent mesurée théoriquement par le photomultiplicateur,  $BL_{CCD}$  : Bioluminescence mesurée par la caméra CCD de Lumisens IV.

#### 6.4.2. Détection d'un évènement de pollution environnementale par Lumisens IV et interprétation des données via le logiciel Metalsoft.

Afin de valider l'association entre le nouveau biocapteur Lumisens IV et le logiciel d'aide à l'interprétation « Metalsoft » (module d'analyse) développé dans le cadre de cette thèse, il était important d'évaluer la capacité de prédiction de l'ensemble. Pour cela, les 4 conditions décrites précédemment (eau distillée avec ou sans mercure [500nM] et eau de sortie de station d'épuration non stérile avec ou sans mercure [500nM]) ont été soumises à l'ensemble des souches bactériennes bioluminescentes dans le biocapteur Lumisens IV. Les données biologiques ont été recueillies par la caméra CCD du biosystème et converties (cf. paragraphe 6.4.1.) afin d'être analysable par « Metalsoft ». Les résultats obtenus sont repris dans le tableau suivant.

**TABLEAU 23 :** EFFICACITE DE PREDICTION POUR LE BIOCAPTEUR LUMISENS IV ASSOCIE AU LOGICIEL D'ANALYSE « METALSOFT »

Matrice	Echantillon				Nombre de répliqués	Gamme de concentration prédite (% d'efficacité)			
	Concentration*					Cadmium	Arsenic III	Mercure	Cuivre
	Cadmium	Arsenic III	Mercure	Cuivre					
Eau distillée	0	0	0	0	13	<25nM (100%)	<500nM (100%)	<500pM (100%)	<5µM (100%)
Eau distillée	0	0	500 nM	0	13	<25nM (100%)	<500nM (100%)	500 pM - 5 µM (100%)	<5µM (100%)
Eau de sortie de station d'épuration <sup>1</sup>	0	0	0	0	39	<25nM (100%)	<500nM (97,4%) <sup>A</sup>	<500pM (100%)	<5µM (94,9%) <sup>B</sup>
Eau de sortie de station d'épuration <sup>1</sup>	0	0	500 nM	0	55	<25nM (100%)	<500nM (98,2%) <sup>A</sup>	500 pM - 5 µM (100%)	<5µM (96,4%) <sup>C</sup>

\* : Concentration ajoutée dans l'échantillon. <sup>1</sup> : Eau de sortie de la station d'épuration de Moulin Grimaud (85000 La Roche sur Yon, 50000 équivalent habitants) brute (non filtrée, et non stérilisée). <sup>A</sup> : Erreur lié à un seul faux positif, <sup>B</sup> : Erreur liée à 2 faux positifs, <sup>C</sup> : Erreur liée à 2 faux négatifs.

Ce tableau reprend les caractéristiques des différents échantillons testés en terme de matrice et de métaux ajoutés. D'après les résultats et malgré les variations observées précédemment, environ 20%, (paragraphe 6.3.1. et 6.3.2.), on constate que les gammes prédites de concentration sont fiables dans 98,75% des cas (taux d'efficacité global). Ceci peut

s'expliquer par la conversion des données de bioluminescence en logarithme abaissant ainsi le taux de variation de 20% à 2%.

### 6.4.3. Conclusion

Le biocapteur Lumisens IV est la continuation d'un projet dans lequel s'intègre les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse mais également dans le cadre des différentes thèses qui se sont succédées auparavant sur cette thématique (Horry 2004, Charrier 2006, Affi 2009).

Contrairement à ses prédécesseurs, Lumisens I, II et III (maintien des bactéries en phase de croissance stationnaire), ce biocapteur de nouvelle génération Lumisens IV repose sur des bactéries bioluminescentes maintenues dans un état figé grâce à la lyophilisation. Ce mode de conservation ne permet pas de régénérer les bactéries après analyse mais il présente toutefois de nombreux avantages.

En effet, les bactéries n'étant plus maintenues en phase de croissance stationnaire, elles n'ont plus besoin d'un apport constant d'oxygène et de nutriments indispensables à leur métabolisme. Par conséquent, les volumes de liquide nécessaire pour une analyse avec ce nouveau système sont moindres : 100µl d'eau distillée par puits avec Lumisens IV contre environ 1200 ml de milieu acétate dilué au dixième (Ac 1/10) stérile (à raison de 2ml.min<sup>-1</sup>) par membrane d'agarose contenant des bactéries pour Lumisens III (un cycle d'induction/régénération soit environ 10 heures contre 1 heure avec Lumisens IV). De plus, l'absence de circulation fluide limite le relargage de bactéries modifiées dans l'environnement et par conséquent, les risques que cela représente pour le milieu naturel : transfert de gènes, résistance aux antibiotiques... Nous avons également pu démontrer dans ce chapitre, que, grâce à ce nouveau mode de conservation des capteurs biologiques, ni le temps ni la microflore présente dans l'environnement ne sont des facteurs limitant contrairement à Lumisens III (phase de stabilisation, apparition de biofilm). L'absence de régénération des bioéléments permet de réduire considérablement l'intervalle entre deux analyses. En effet, si nécessaire, le biocapteur Lumisens IV est capable de réaliser jusqu'à une analyse par minute.

Enfin, les résultats obtenus montrent qu'en associant Lumisens IV au logiciel d'analyse des données « Metalsoft », on obtient l'un des tous premiers bio-systèmes analytiques, reposant sur des bactéries bioluminescentes, capable de suivre en ligne et en continu, d'une part, le niveau de contamination de polluants spécifiques (métaux) dans un effluent en s'attachant uniquement à sa fraction biodisponible et d'autre part, de renseigner sur la toxicité globale de toxicité globale de l'effluent.

## **Discussion**

---

Comme nous avons pu le démontrer au cours de cette thèse, les biocapteurs bactériens bioluminescents étaient jusqu'à maintenant des outils potentiellement intéressants pour le suivi de pollution aquatique. Cependant, ces systèmes biologiques ne sortaient pas des laboratoires et ce, pour plusieurs raisons. D'une part, un premier problème se posait quant à l'utilisation de bioéléments bactériens bioluminescents pour la détection de polluants métalliques dans l'eau. En effet, la littérature scientifique consacrée à l'évaluation, la caractérisation ou l'utilisation de ces capteurs souligne leur faible spécificité.

D'autre part, la bibliographie réalisée sur les biocapteurs bactériens ne permettait pas de classer ces nouveaux systèmes comme outils analytiques fiables en raison de l'absence totale de caractérisation efficace : aucune étude publiée ne vise à évaluer les limites de ces outils biologiques en laboratoire (stabilité dans le temps) et/ou en conditions environnementales. Aussi, l'objectif de cette thèse était de répondre à ces deux problématiques.

## **1. Développement d'un outil d'analyse des réponses des bioéléments bactériens**

Le développement d'un outil statistique dédié à l'analyse des données de bioluminescence fournies par des bioéléments bactériens a été le premier objectif traité au cours de notre étude. Jusqu'à maintenant, la faible spécificité des bioéléments bactériens limitait leur utilisation au strict cadre expérimental. En effet, certains d'entre eux étant susceptibles de répondre à de nombreux composés, il est particulièrement délicat de fournir une interprétation fiable et pertinente des réponses de ces capteurs biologiques.

Depuis peu, certaines équipes s'intéressent au développement d'outils pour l'analyse des données de bioluminescence bactérienne. Une étude récente, publiée par Elad *et al.* (2008) vise à identifier cinq composés chimiques toxiques (paraquat, cyanide de potassium, parathion...) au travers de cinq souches bactériennes bioluminescentes inductibles associées à un modèle d'algorithme de classification. Ainsi, grâce à cette association, le taux d'erreur d'identification (approche qualitative) n'excède pas 3%. Cependant, les notions de mélange de plusieurs composés et de concentration n'ont pas été à notre connaissance abordées.

L'objectif de cette première partie de thèse était plus ambitieux : mettre au point un modèle capable d'identifier quatre composés (cadmium, arsenic III, mercure et cuivre) en mélange et à différentes concentrations à partir de cinq souches bactériennes bioluminescentes (*E.coli* K12 MG1655 pBZntlux, *E.coli* K12 MG1655 pBARslux, *E.coli* K12 MG1655 pBMerlux, *E.coli* K12 MG1655 pBCoplux et *E.coli* DH1 pBTAclux) et ainsi d'élever le niveau d'interprétation à un niveau semi-quantitatif (notion de concentration).

Pour cela, nous avons choisi l'approche statistique par arbre de décision : méthode graphique à apprentissage supervisé (reposant sur une base de données préétablie). La base de données a été construite à partir d'un plan d'expérience ayant pour rôle d'assurer l'homogénéité dans le choix des conditions à réaliser. Cette étape supplémentaire, non indispensable, nous a également permis de valider un objectif indirect : appliquer le concept de plan d'expérience sur ce type de données. En effet, dans un développement futur, il est tout à fait envisageable

d'ajouter des conditions, par conséquent, le nombre de conditions augmentera exponentiellement : si on ajoute un composé, le nombre de conditions à tester passe de 256 ( $4^4$ ) à 1024 ( $4^5$ ) d'où l'intérêt de réduire le nombre de conditions par plan d'expérience.

A partir de cette base de données, un modèle statistique a été mis au point intégrant une batterie de 4 arbres de décision, chacun d'eux étant dédié à l'identification et à la semi-quantification d'un composé. Ainsi, à partir des seules données de bioluminescence fournies par les différentes souches bactériennes, nous avons pu montrer que cet outil d'analyse permettait d'identifier et de semi-quantifier correctement ces quatre composés dans l'environnement avec un taux d'efficacité avoisinant les 95% des cas.

Un défaut réside toutefois dans cette approche. En effet, de part sa structure en arbre, le modèle n'a d'autre choix que de proposer un classement pour l'échantillon testé. Aussi, en présence d'autres composés inducteurs, comme par exemple du plomb (capable d'induire la souche *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux), on peut s'attendre à une prédiction erronée du modèle mettant en évidence la présence de cadmium dans l'échantillon. Pour éviter ce type d'erreur, il est important de développer d'autres arbres de décision dédiés à l'identification spécifique d'autres composés (dans ce cas, le plomb). Par conséquent, le nombre de capteurs bactériens inductibles devra être multiplié et pour cela, plusieurs directions sont envisageables :

- développement de nouvelles constructions génétiques (autres promoteurs) (Verma and Singh 2005, Monchy *et al.* 2007, Ivask *et al.* 2009),
- transfert des constructions plasmidiques existantes vers d'autres souches bactériennes hôtes (Hakkila *et al.* 2004, Ivask *et al.* 2009)
- mutation aléatoire des promoteurs inductibles utilisés en vue de modifier leur spécificité et/ou leur sensibilité.

Enfin le modèle ne protège pas des problèmes liés à la spécificité des capteurs. En effet, dans notre étude, nous nous sommes limités à l'étude de la spécificité des souches bactériennes inductibles en présence de métaux (constructions génétiques décrites comme spécifique de ces composés). Toutefois, il apparaît que certaines souches bactériennes soient susceptibles d'induire une réponse de bioluminescence significative en présence de composés inattendus : par exemple, la souche *E.coli* DH1 pBZntlux (même plasmide mais souche hôte différente que *E.coli* K12 MG1655 pBZntlux) est induite par un composé organométallique, le tributylétain.

## 2. Compréhension biologique du biocapteur Lumisens III

La caractérisation du biocapteur Lumisens III était le second objectif abordé au cours de cette thèse. L'enjeu était, d'une part, d'améliorer notre compréhension de ce biocapteur en s'attachant plus particulièrement à la biologie des bioéléments bactériens immobilisés dans la carte de mesure (évolution des bactéries dans le système) et d'autre part, d'observer l'influence de matrice environnementale sur le biocapteur.

Le premier point critiquable de ce système concerne le temps nécessaire à une analyse. En effet, avec Lumisens III, un cycle d'analyse, incluant l'induction des bactéries suivie d'une phase de régénération cellulaire, approche les 10 heures. Par conséquent, le nombre d'analyse quotidienne se limite à 2.

Malgré cela, en conditions maîtrisées de laboratoire, le biocapteur apparaît comme un outil stable dans une fenêtre de mesure de 4 à 5 jours enclavée entre deux périodes d'instabilité : croissance des bactéries dans le système (3 jours) et colonisation des supports par les bactéries bioluminescence. Par conséquent, au vu du temps nécessaire pour équilibrer le système (croissance des bactéries), la fenêtre de mesure semble relativement réduite. D'autre part, la colonisation des surfaces de la carte de mesure met en évidence un phénomène de relargage des bactéries en dehors de la matrice d'agarose censée immobiliser les bactéries. Etant donnée la circulation constante de liquide dans le système (alimentation des bactéries immobilisées en oxygène et en nutriments), certaines bactéries sont emportées par cette circulation et par conséquent, se retrouvent libérées dans le milieu naturel avec l'ensemble des risques associés : transfert de gènes, résistance aux antibiotiques...

En outre, l'étude réalisée sur des matrices environnementales montre que ce système n'est pas totalement approprié à une utilisation dans l'environnement. En effet, il apparaît que la microflore environnementale perturbe considérablement le système à un point tel, que ce dernier est en incapacité totale de mettre en évidence la présence d'un métal au delà du second jour.

Cette étape a permis d'écarter définitivement ce biocapteur en raison du mode maintien des bactéries bioluminescentes (phase stationnaire de croissance) au profit d'un nouveau système : Lumisens IV.

### **3. Développement d'un système de suivi en ligne des pollutions métalliques intégrant un outil d'analyse des données : Lumisens IV**

Le développement de Lumisens IV a été la conclusion de ce travail. L'objectif était de développer un nouveau biosystème en s'appuyant sur l'ensemble des connaissances acquises au cours des deux premiers axes de travail.

Le maintien des bactéries en phase stationnaire de croissance ayant été écarté, nous avons choisi pour ce nouveau système de conserver les bactéries sous une forme lyophilisée. Ce mode de conservation, n'acceptant pas de régénération, ne permet pas de réutiliser les bactéries après analyse mais présente un certain nombre d'avantages :

- Stabilité dans le temps. La fenêtre de mesure est illimitée dans le temps et n'est plus enclavée entre phase de croissance et phase de colonisation.
- Système approprié à l'environnement. Les analyses étant indépendantes, il n'y a plus d'influence de la microflore environnementale sur la détection.

D'autre part, le mode de conservation des capteurs biologiques a permis également le transfert des données de bioluminescence vers le logiciel d'analyse « Metalsoft » afin d'améliorer la

lecture des informations fournies par ce nouveau système. Ainsi couplé (Lumisens IV/Metalsoft), ce nouveau système apparaît comme la nouvelle génération d'outil biologique pour le suivi en ligne et en continu de pollution métallique en milieu aquatique.

Toutefois, l'utilisation de bactéries bioluminescentes inductibles engendre l'ensemble des difficultés exposées précédemment (erreur de prédiction lié à la présence d'autre inducteur, spécificité inattendue). Aussi, le développement de cet outil analytique passera obligatoirement par l'amélioration du modèle statistique d'analyse avec d'une part, l'augmentation du nombre d'arbre de décision (un par composés recherchés) et d'autre part, la multiplication du nombre de capteurs bactériens inductibles (détection croisée, spécificité et/ou sensibilité différentes).

Enfin, une amélioration devra être apportée sur le système d'un point de vue technologique. En effet, l'utilisation d'une caméra CCD pour la détection de la bioluminescence présente l'avantage d'obtenir une capture globale de l'ensemble des bactéries, toutefois, la sensibilité de ce capteur reste pour le moment moins élevée qu'un photomultiplicateur, plus complexe à mettre en œuvre.

## **Perspectives**

---

Dans un contexte de suivi en ligne de pollutions métalliques, ce nouveau système (Lumisens IV associé à Metalsoft) apparaît comme un outil analytique intéressant. En effet, les premiers résultats réalisés en laboratoire avec des échantillons environnementaux mettent en évidence la capacité du système à identifier et semi-quantifier, avec pertinence, les métaux présents dans ces échantillons.

Toutefois, avant la phase ultime de transfert technologique vers l'industrie, un certain nombre de points reste à déterminer. Outre les limites biologiques associées aux capteurs bactériens évoquées dans le chapitre précédent (cf. Discussion 1. Développement d'un outil d'analyse des réponses des bioéléments bactériens), les échantillons environnementaux utilisés pour la validation du biocapteur Lumisens IV présentaient une diversité relativement restreinte : 18 échantillons environnementaux mais seulement 3 sources de prélèvement. Par conséquent, ces derniers étaient relativement proches, en terme de pH et de turbidité, des échantillons artificiels de laboratoire (matrice : eau distillée) contrairement à la conductimétrie qui pouvait varier de  $900 \text{ mS.cm}^{-1}$  à  $0,25 \text{ mS.cm}^{-1}$  en fonction des échantillons ( $0 \text{ mS.cm}^{-1}$  pour la matrice « eau distillée »). Aussi, il serait intéressant de déterminer, avec précision, les conditions « limites » d'utilisation de ce biocapteur afin de prévenir d'éventuelles difficultés quant à l'efficacité de prédiction du système.

Enfin, la validation *in situ* est une étape préalable indispensable au transfert technologique afin d'évaluer la robustesse du système dans le cadre d'une utilisation par un personnel non-spécialiste ; l'objectif étant d'évaluer la simplicité d'utilisation du biocapteur ainsi que la lisibilité des informations fournies par le logiciel d'interprétation de données.

## **Références bibliographiques**

---

- Abe, K., Y. Sakurai, A. Okuyama, K. Sasaki and K. Tawarada**, 2009. Simplified method for determining cadmium concentrations in rice foliage and soil by using a biosensor kit with immunochromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89,6: 1097-1100.
- Affi, M.**, 2009. Optimisation des écoulements et des transferts de matière dans un mini-système de détection en continu de polluants par des bactéries bioluminescentes. *E.D. Sciences pour l'ingénieur, géosciences, et architecture, Université de Nantes, Génie des procédés*
- Affi, M., C. Sollicec, P. Legentillomme, J. Comiti, J. Legrand and G. Thouand**, 2009. Numerical design of a card and related physicochemical phenomena occurring inside agarose-immobilized bacteria: A valuable tool for increasing our knowledge of biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, In Press, Corrected Proof,
- AFNOR-ISO.5667-3**, 2004. Qualité de l'eau : Echantillonnage, *Partie 3 : Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau*.
- Almendras, M.-L., M. Carballa, L. Diels, K. Vanbroekhoven and R. Chamy**, 2009. Prediction of Heavy Metals Mobility and Bioavailability in Contaminated Soil Using Sequential Extraction and Biosensors. *Journal of Environmental Engineering*, 135,9: 839-844.
- Anderson, J. L., E. F. Bowden and P. G. Pickup**, 1996. Dynamic Electrochemistry: Methodology and Application. *Analytical Chemistry*, 68,12: 379-444.
- Atlas, R. M.**, 1997. Handbook of Microbiological Media. Second Edition. *CRC press*.
- Ball, P.**, 1999. Applications of microporous membranes in sensor technology. *Sensor Review*, 19: 46-51.
- Belkin, S.**, 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Opin Microbiol*, 6,3: 206-212.
- Ben-Israel, O., H. Ben-Israel and S. Ulitzur**, 1998. Identification and Quantification of Toxic Chemicals by Use of Escherichia coli Carrying lux Genes Fused to Stress Promoters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64,11: 4346-4352.
- Benkhedda, K., H. G. Infante, F. C. Adams and E. Ivanova**, 2002. Inductively coupled plasma mass spectrometry for trace analysis using flow injection on-line preconcentration and time-of-flight mass analyser. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21,5: 332-342.
- Binet, M. R. B. and R. K. Poole**, 2000. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in Escherichia coli. *FEBS Letters*, 473,1: 67-70.
- Biran, I. and D. R. Walt**, 2002. Optical imaging fiber-based single live cell arrays: a high-density cell assay platform. *Anal Chem*, 74,13: 3046-3054.
- Bitton, G., B. Koopman and O. Agami**, 1992. A Bioassay for Rapid Assessment of Heavy Metal Toxicity in Wastewater. *Water Environment Research*, 64,6: 834-836
- Bock Gu, M. and G. Cheol Gil**, 2001. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity. *Biosensors and Bioelectronics*, 16,9-12: 661-666.
- Bonnard, N., M. Falcy, A. Hesbert, D. Jargot, F. Pillière, O. Schneider and P. Serre**, 2006. Fiche toxicologique: Plomb et composés minéraux, *INRS*
- Breiman, L., J. Friedman, R. Olshen and S. C.**, Eds. (1984). Classification and Regression Tree. New York, Chapman and Hall.

- Brown, N. L., Y. C. Shih, C. Leang, K. J. Glendinning, J. L. Hobman and J. R. Wilson**, 2002. Mercury transport and resistance. *Biochem Soc Trans*, 30,4: 715-718.
- Burlage, R. S.**, 1998. Organic contaminant detection and biodegradation characteristics. *Methods Mol Biol*, 102: 259-268.
- Cai, J. and M. S. DuBow**, 1996. Expression of the Escherichia coli chromosomal ars operon. *Can J Microbiol*, 42,7: 662-671.
- Charrier, T.**, 2006. Développement d'un biocapteur bactérien bioluminescent multicanal pour la détection de polluants dans l'environnement. *Nantes, University of Nantes, Ph.D. thesis*
- Charrier, T., M. J. Durand, S. Jouanneau, M. Dion, M. Perneti, D. Poncelet and G. Thouand**, 2010a. 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*,
- Charrier, T., M.J. Durand, M. Affi, S. Jouanneau, H. Gezekel and G. Thouand**, 2010b. Bacterial Bioluminescent Biosensor Characterisation for On-line Monitoring of Heavy Metals Pollutions in Waste Water Treatment Plant Effluents. *Biosensors P. A. Serra. INTECH*. p 179-206.
- Condee, C. W. and A. O. Summers**, 1992. A mer-lux transcriptional fusion for real-time examination of in vivo gene expression kinetics and promoter response to altered superhelicity. *J. Bacteriol.*, 174,24: 8094-8101.
- Cookson, B. T., D. E. Berg and W. E. Goldman**, 1990. Mutagenesis of Bordetella pertussis with transposon Tn5tac1: conditional expression of virulence-associated genes. *J. Bacteriol.*, 172,4: 1681-1687.
- Corbisier, P., G. Ji, G. Nuyts, M. Mergeay and S. Silver**, 1993. luxAB gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of Staphylococcus aureus plasmid pI258. *FEMS Microbiol Lett*, 110,SV: 231-238.
- Corbisier, P., E. Thiry, A. Masolijn and L. Diels**, 1994. Construction and development of metal ion biosensors. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*. A. K. C. Philip E. Stanley, Larry J. Kricka. John Wiley & Sons. 150-155.
- Corbisier, P., D. Van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. de Lorenzo, N. L. Brown, J. R. Lloyd, J. L. Hobman, E. Csoregi, G. Johansson and B. Mattiasson**, 1999. Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 387,3: 235-244.
- D'Souza, S. F.**, 2001. Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16,6: 337-353.
- De Boer, H. A., L. J. Comstock and M. Vasser**, 1983. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80,1: 21-25.
- Dmitriev, L. F.**, 2000. Bacterial luminescence: luminescence mechanism with cyclic peroxide participation and dependence on reactive oxygen species (a hypothesis). *Biochimie*, 82,3: 237-244.
- Dorn, J. G., R. J. Frye and R. M. Maier**, 2003. Effect of temperature, pH, and initial cell number on luxCDABE and nah gene expression during naphthalene and salicylate catabolism in the bioreporter organism Pseudomonas putida RB1353. *Appl Environ Microbiol*, 69,4: 2209-2216.

- Durand, M. J., G. Thouand, T. Dancheva-Ivanova, P. Vachon and M. DuBow**, 2003. Specific detection of organotin compounds with a recombinant luminescent bacteria. *Chemosphere*, 52,1: 103-111.
- Elad, T., E. Benovich, S. Magrisso and S. Belkin**, 2008. Toxicant identification by a luminescent bacterial bioreporter panel: application of pattern classification algorithms. *Environ Sci Technol*, 42,22: 8486-8491.
- Eltzov, E. and R. S. Marks**, 2010. Fiber-optic based cell sensors. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 117: 131-154.
- Erbe, J. L., A. C. Adams, K. B. Taylor and L. M. Hall**, 1996. Cyanobacteria carrying an smt-lux transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. *J Ind Microbiol*, 17,2: 80-83.
- Ervin, A. M., A. M., R. A. Lamontagne, K. J. Ewing, I. D. Aggarwal and D. A. Rowley**, 1993. Development of a fiber-optic sensor for trace metal detection in aqueous environments. *Applied Optics*, 32,22: pp.4287-4290.
- Fisher, A. J., T. B. Thompson, J. B. Thoden, T. O. Baldwin and I. Rayment**, 1996. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *J Biol Chem*, 271,36: 21956-21968.
- Fisher, R.**, 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals Eugen.*, 7: 179-188.
- Galluzzi, L. and M. Karp**, 2007. Intracellular redox equilibrium and growth phase affect the performance of luciferase-based biosensors. *J Biotechnol*, 127,2: 188-198.
- Gambill, B. D. and A. O. Summers**, 1985. Versatile mercury-resistant cloning and expression vectors. *Gene*, 39,2-3: 293-297.
- Graeme, K. A. and C. V. Pollack**, 1998. Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *Journal of Emergency Medicine*, 16,1: 45-56.
- Grass, G., C. Grosse and D. H. Nies**, 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol*, 182,5: 1390-1398.
- Gu, B. M. and C. G. Gil**, 2001. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity. *Biosensors and Bioelectronics*, 16,9-12: 661-666.
- Gueuné, H.**, 2007. Développement de bioessais à l'aide de bactéries génétiquement modifiées pour la détection de polluants environnementaux. *ED Chimie et biologie, université de Nantes*,
- Gueune, H., M. J. Durand, G. Thouand and M. S. DuBow**, 2008. The *ygaVP* genes of *Escherichia coli* form a tributyltin-inducible operon. *Appl Environ Microbiol*, 74,6: 1954-1958.
- Gueune, H., G. Thouand and M. J. Durand**, 2009. A new bioassay for the inspection and identification of TBT-containing antifouling paint. *Mar Pollut Bull*, 58,11: 1734-1738.
- Guzzo, A., C. Diorio and M. S. DuBow**, 1991. Transcription of the *Escherichia coli* *fliC* gene is regulated by metal ions. *Appl Environ Microbiol*, 57,8: 2255-2259.
- Hakkila, K., T. Green, P. Leskinen, A. Ivask, R. Marks and M. Virta**, 2004. Detection of bioavailable heavy metals in EILATox-Oregon samples using whole-cell luminescent

- bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre-optic tips. *J Appl Toxicol*, 24,5: 333-342.
- Hakkila, K., M. Maksimow, M. Karp and M. Virta**, 2002. Reporter Genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors. *Analytical Biochemistry*, 301,2: 235-242.
- Hansen, L. H. and S. J. Sørensen**, 2000. Versatile biosensor vectors for detection and quantification of mercury. *FEMS Microbiology Letters*, 193,1: 123-127.
- Harms, H.**, 2007. Biosensing of Heavy Metals. 143-157.
- Heitzer, A., K. Malachowsky, J. E. Thonnard, P. R. Bienkowski, D. C. White and G. S. Saylor**, 1994. Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 60,5: 1487-1494.
- Holmes, D. S., S. K. Dubey and S. Gangolli**, 1994. Development of biosensors for the detection of mercury and copper ions. *Environmental Geochemistry and Health*, 16,3: 229-233.
- Horry, H.**, 2004. Développement d'un biocapteur bactérien bioluminescent pour la détection d'organoétains. *Thèse Université de Nantes*,
- Horry, H., T. Charrier, M. J. Durand, B. Vrignaud, P. Picart, P. Daniel and G. Thouand**, 2007. Technological conception of an optical biosensor with a disposable card for use with bioluminescent bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 122,2: 527-534.
- Horry, H., M. J. Durand, P. Picart, L. Bendriaa, P. Daniel and G. Thouand**, 2004. Development of a biosensor for the detection of tributyltin. *Environ Toxicol*, 19,4: 342-345.
- Huckle, J. W., A. P. Morby, J. S. Turner and N. J. Robinson**, 1993. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol*, 7,2: 177-187.
- Inouye, S.**, 1994. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Letters*, 347,2-3: 163-168.
- Ivask, A., T. Green, B. Polyak, A. Mor, A. Kahru, M. Virta and R. Marks**, 2007. Fibre-optic bacterial biosensors and their application for the analysis of bioavailable Hg and As in soils and sediments from Aznalcollar mining area in Spain. *Biosensors and Bioelectronics*, 22,7: 1396-1402.
- Ivask, A., K. Hakkila and M. Virta**, 2001. Detection of organomercurials with sensor bacteria. *Anal Chem*, 73,21: 5168-5171.
- Ivask, A., T. Rolova and A. Kahru**, 2009. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnol*, 9: 41.
- Ivask, A., M. Virta and A. Kahru**, 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 Biology and Biochemistry*, 34,10: 1439-1447.
- Jackson, K. W. and T. M. Mahmood**, 2002. Atomic Absorption, Atomic Emission, and Flame Emission Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 66,12: 252R-279R.
- Kain, S. R. and P. Kitts**, 1997. Expression and detection of green fluorescent protein (GFP). *Methods Mol Biol*, 63: 305-324.

- Kass, G. V.**, 1980. An Exploratory Technique for Investigating Large Quantities of Categorical Data. *Applied Statistics*, 29,2: 119-127.
- Khosraviani, M., A. R. Pavlov, G. C. Flowers and D. A. Blake**, 1998. Detection of Heavy Metals by Immunoassay: Optimization and Validation of a Rapid, Portable Assay for Ionic Cadmium. *Environmental Science & Technology*, 32,1: 137-142.
- Kittel, C.**, 1998. Physique de l'état solide. *Dunod*.
- Kobatake, E., T. Niimi, T. Haruyama, Y. Ikariyama and M. Aizawa**, 1995. Biosensing of benzene derivatives in the environment by luminescent *Escherichia coli*. *Biosens Bioelectron*, 10,6-7: 601-605.
- Koga, K., T. Harada, H. Shimizu and K. Tanaka**, 2005. Bacterial luciferase activity and the intracellular redox pool in *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics*, 274,2: 180-188.
- Köhler, S., S. Belkin and R. D. Schmid**, 2000. Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366,6: 769-779.
- Korpela, M., P. Mantsala, E. M. Lilius and M. Karp**, 1989. Stable-light-emitting *Escherichia coli* as a biosensor. *J Biolumin Chemilumin*, 4,1: 551-554.
- La Rocca, B., N. Houeix and S. Andres**, 2010. Arsenic et ses dérivés inorganiques. *INERIS*
- Lee, J. H. and M. B. Gu**, 2005. An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1744-1749.
- Leenen, E. J. T. M., V. A. P. Dos Santos, K. C. F. Grolle, J. Tramper and R. Wijffels**, 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research*, 30,12: 2985-2996.
- Lei, Y., W. Chen and A. Mulchandani**, 2006. Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta Molecular Electronics and Analytical Chemistry*, 568,1-2: 200-210.
- Leth, S., S. Maltoni, R. Simkus, B. Mattiasson, P. Corbisier, I. Klimant, O. Wolfbeis and E. Csöregi**, 2002. Engineered Bacteria Based Biosensors for Monitoring Bioavailable Heavy Metals. *Electroanalysis*, 14,1: 35-42.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui and H. G. Schlegel**, 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol*, 175,3: 767-778.
- Lin, L., L. L. Xiao, S. Huang, L. Zhao, J. S. Cui, X. H. Wang and X. Chen**, 2006. Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix. *Biosens Bioelectron*, 21,9: 1703-1709.
- Mackey, B. M., D. Cross and S. F. Park**, 1994. Thermostability of bacterial luciferase expressed in different microbes. *J Appl Bacteriol*, 77,2: 149-154.
- Magrisso, S., Y. Erel and S. Belkin**, 2008. Microbial reporters of metal bioavailability. *Microbial Biotechnology*, 1,4: 320-330.
- Marsala, C.**, 1998. Apprentissage inductif en présence de données imprécises : construction et utilisation d'arbres de décision flous. *Informatique, Paris 6, Informatique*
- MEDD, Ministère de l'écologie et du développement d.**, 2002. Principaux rejets industriels en FRANCE : Bilan de l'année 2002, *Direction de la prévention des pollutions et des r. Service de l'environnement industriel*

- Medvedeva, S., A. Boyandin, Y. Lankin, D. Kotov, T. Kargatova, E. Rodicheva and L. Popova**, 2005. A database on natural and transgenic luminous microorganisms: BiolumBase. *Microbiology*, 74,2: 236-243.
- Medvedeva, S., D. Kotov and E. Rodicheva**, 2008. Database of natural luminescent bacteria. *Contemporary Problems of Ecology*, 1,1: 120-126.
- Meighen, E.**, 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev*, 55,1: 123-142.
- Meighen, E.**, 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J.*, 7,11: 1016-1022.
- Michan, C., M. Manchado, G. Dorado and C. Pueyo**, 1999. In vivo transcription of the Escherichia coli oxyR regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J Bacteriol*, 181,9: 2759-2764.
- Mimendia, A., A. Legin, A. Merkoçi and M. del Valle**, 2009. Use Of Sequential Injection Analysis to Construct a Potentiometric Electronic Tongue: Application to the Multidetermination of Heavy Metals. *Sensors and Actuators B: Chemical*, In Press, Accepted Manuscript,
- Miquel, G.**, 2001. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. , *Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques*
- Monchy, S., M. A. Benotmane, P. Janssen, T. Vallaey, S. Taghavi, D. Van Der Lelie and M. Mergeay**, 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of Cupriavidus metallidurans Are Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *J Bacteriol.*, 189,20: 7417-7425.
- Moore, C. M., A. Gaballa, M. Hui, R. W. Ye and J. D. Helmann**, 2005. Genetic and physiological responses of Bacillus subtilis to metal ion stress. *Mol Microbiol*, 57,1: 27-40.
- Morgan, J. N. and J. A. Sonquist**, 1963. Problems in the analysis of survey data, and a proposal. 58: 415-434.
- Mulchandani, A. and K. R. Rogers**, 1998. Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols. *Humanae Press*.
- Nealson, K. H. and J. W. Hastings**, 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev*, 43,4: 496-518.
- Neilson, J. W., S. A. Pierce and R. M. Maier**, 1999. Factors influencing expression of luxCDABE and nah genes in Pseudomonas putida RB1353(NAH7, pUTK9) in dynamic systems. *Appl Environ Microbiol*, 65,8: 3473-3482.
- Nies, D. H.**, 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51,6: 730-750.
- Nordberg, M., J. H. Duffus and D. M. Templeton**, 2010. Explanatory dictionary of key terms in toxicology: Part II (IUPAC Recommendations 2010). *Pure Appl. Chem.*, 82,3: 679-751.
- Peitzsch, N., G. Eberz and D. H. Nies**, 1998. Alcaligenes eutrophus as a Bacterial Chromate Sensor. *Appl Environ Microbiol*, 64,2: 453-458.
- Pernetti, M.**, 2004. Systèmes biologiques pour le monitoring des eaux : Aspects d'ingénieur, du laboratoire à la mesure sur le terrain. *Mécanique, Thermique et Genie Civil, Université "La Sapienza", Rome, These de Doctorat*

- Pernetti, M., D. Poncelet and G. Thouand**, 2009. Properties and choice of material used for microbial biosensor. *Biosensors: Properties, Materials and Applications*. N. P. E. Comeaux R. Nova Science Publisher. 87-126.
- Pichard, A., M. Bisson, R. Diderich, B. Doornaert, G. Lacroix, J. P. Lefevre, S. Leveque, H. Magaud, A. Morin, D. Oberon, G. Pepin, S. Tissot and C. Gillet**, 2006a. Mercure et ses dérivés. *INERIS*
- Pichard, A., M. Bisson, R. Diderich, N. Houeix, C. Hulot, G. Lacroix, J. P. Lefevre, S. Leveque, H. Magaud, A. Morin, G. Pepin and C. Gillet**, 2005a. Cadmium et ses dérivés. *INERIS*
- Pichard, A., M. Bisson, N. Houeix, G. Gay, B. Jolibois, G. Lacroix, J. P. Lefevre, H. Magaud, V. Migne, A. Morin, S. Tissot and C. Gillet**, 2006b. Cobalt et ses dérivés. *INERIS*
- Pichard, A., M. Bisson, N. Houeix, G. Gay, B. Jolibois, G. Lacroix, J. P. Lefevre, H. Magaud, A. Morin, S. Tissot and C. Gillet**, 2006c. Nickel et ses dérivés. *INERIS*
- Pichard, A., M. Bisson, N. Houeix, G. Gay, G. Lacroix, J. P. Lefevre, H. Magaud, V. Migne, A. Morin, S. Tissot and C. Gillet**, 2005b. Cuivre et ses dérivés. *INERIS*
- Pichard, A., M. Bisson, N. Houeix, C. Hulot, G. Lacroix, J. P. Lefevre, S. Leveque, H. Magaud, A. Morin, L. Cornu and C. Gillet**, 2006d. Arsenic et ses dérivés inorganiques. *INERIS*
- Pichard, A., M. Bisson, C. Hulot, G. Lacroix, J. P. Lefevre, D. Oberson-Geneste, H. Magaud, A. Morin, G. Pepin and C. Gillet**, 2003. Plomb et ses dérivés. *INERIS*
- Pooley, D. T., J. Larsson, G. Jones, M. H. Rayner-Brandes, D. Lloyd, C. Gibson and W. R. Stewart**, 2004. Continuous culture of photobacterium. *Biosensors and Bioelectronics, Micro and Nano Bioengineering*, 19,11: 1457-1463.
- Quinlan, J. R.**, 1993. C4.5: programs for machine learning. *Morgan Kaufmann Publishers Inc.*
- Quinlan, R.**, 1979. Discovering rules by induction from large collections of examples. *Expert Systems in the Microelectronic age*. D. M. ed. Edinburgh University Press. 168-201.
- Rahafrooz, A. and S. Pourkamali**, 2009. Detection of sub-ppm traces of aqueous heavy-metal ions using micro-electro-mechanical beam resonators. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11: 115003.
- Rakotomalala, R.**, 2005. Arbres de Décision. *Modulad*, 33: 163-187.
- Ramanathan, S., M. Ensor and S. Daunert**, 1997. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *Trends in Biotechnology*, 15,12: 500-506.
- Riether, K. B., M. A. Dollard and P. Billard**, 2001. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57,5-6: 712-716.
- Roach, P. C., D. K. Ramsden, J. Hughes and P. Williams**, 2003. Development of a conductimetric biosensor using immobilised *Rhodococcus ruber* whole cells for the detection and quantification of acrylonitrile. *Biosens Bioelectron*, 19,1: 73-78.
- Rurack, K., U. Resch, M. Senoner and S. Dähne**, 1993. A new fluorescence probe for trace metal ions: Cation-dependent spectroscopic properties. *Journal of Fluorescence*, 3,3: 141-143.

- Sambrook, J. and D. T. Russell**, 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3ème édition. *Cold Spring Harbor*.
- Sasaki, K., O. Naoya and K. Tawarada**, 2009. Cadmium Rapid Test Kit using Cadmium Purification Column and Cadmium Immunochromatography. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40,1: 345 - 351.
- Satoh, I.**, 1991. An apoenzyme thermistor microanalysis for zinc(II) ions with use of an immobilized alkaline phosphatase reactor in a flow system. *Biosensors and Bioelectronics*, 6,4: 375-379.
- Selifonova, O., R. Burlage and T. Barkay**, 1993. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 59,9: 3083-3090.
- Semple, K. T., K. J. Doick, K. C. Jones, P. Burauel, A. Craven and H. Harms**, 2004. Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environmental Science & Technology*, 38,12: 228A-231A.
- Shekhovtsova, T. N., S. V. Muginova and N. A. Bagirova**, 1997. Determination of organomercury compounds using immobilized peroxidase. *Analytica Chimica Acta*, 344,1-2: 145-151.
- Simpson, M. L., G. S. Sayler, B. M. Applegate, S. Ripp, D. E. Nivens, M. J. Paulus and G. E. Jellison**, 1998. Bioluminescent-bioreporter integrated circuits form novel whole-cell biosensors. *Trends in Biotechnology*, 16,8: 332-338.
- Skerfving, S.**, 1998. Heavy metal toxicology. *Applied Radiation and Isotopes*, 49,5-6: 697-697.
- Sticher, P., M. C. Jaspers, K. Stemmler, H. Harms, A. J. Zehnder and J. R. van der Meer**, 1997. Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. *Appl Environ Microbiol*, 63,10: 4053-4060.
- Stocker, J., D. Balluch, M. Gsell, H. Harms, J. Feliciano, S. Daunert, K. A. Malik and J. R. van der Meer**, 2003. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol*, 37,20: 4743-4750.
- Stoyanov, J. V. and N. L. Brown**, 2003. The Escherichia coli copper-responsive copA promoter is activated by gold. *J Biol Chem*, 278,3: 1407-1410.
- Szittner, R. and E. Meighen**, 1990. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. *Journal of Biological Chemistry*, 265,27: 16581-16587.
- Tauriainen, S., M. Karp, W. Chang and M. Virta**, 1997. Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl Environ Microbiol*, 63,11: 4456-4461.
- Tauriainen, S., M. Karp, W. Chang and M. Virta**, 1998. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. *Biosensors and Bioelectronics*, 13,9: 931-938.
- Thevenot, D. R., K. Toth, R. A. Durst and G. S. Wilson**, 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*, 16,1-2: 121-131.
- Thouand, G., P. Daniel, H. Horry, P. Picart, M. J. Durand, K. Killham, O. G. Knox, M. S. DuBow and M. Rousseau**, 2003a. Comparison of the spectral emission of lux recombinant and bioluminescent marine bacteria. *Luminescence*, 18,3: 145-155.

- Thouand, G., H. Horry, M. J. Durand, P. Picart, L. Bendriaa, P. Daniel and M. S. DuBow**, 2003b. Development of a biosensor for on-line detection of tributyltin with a recombinant bioluminescent *Escherichia coli* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 62,2-3: 218-225.
- Tibazarwa, C., P. Corbisier, M. Mench, A. Bossus, P. Solda, M. Mergeay, L. Wyns and D. van der Lelie**, 2001. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environmental Pollution*, 113,1: 19-26.
- Trajanovska, S., M. L. Britz and M. Bhave**, 1997. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation*, 8,2: 113-124.
- Ulitzur, S.**, 1989. The regulatory control of the bacterial luminescence system--a new view. *J Biolumin Chemilumin*, 4,1: 317-325.
- Vassilev, V., M. Radonova and S. Boycheva**, 2009. Cd(II)-ion-selective electrode based on chalcogenide glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 355,48-49: 2365-2369.
- Verma, N. and M. Singh**, 2005. Biosensors for heavy metals. *BioMetals*, 18,2: 121-129.
- Wang, A. and D. E. Crowley**, 2005. Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 187,9: 3259-3266.
- Willardson, B. M., J. F. Wilkins, T. A. Rand, J. M. Schupp, K. K. Hill, P. Keim and P. J. Jackson**, 1998. Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl Environ Microbiol*, 64,3: 1006-1012.
- Wiśniewska-Knypl, J. M., J. Jabłońska and Z. Myślak**, 1972. Binding of cadmium on metallothionein in man: an analysis of a fatal poisoning by cadmium iodide. *Archives of Toxicology*, 28,1: 46-55.
- Wong, K.-Y., M.-Q. Zhang, X.-M. Li and W. Lo**, 1997. A luminescence-based scanning respirometer for heavy metal toxicity monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 12,2: 125-133.
- Yoon, K. P., T. K. Misra and S. Silver**, 1991. Regulation of the *cadA* cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol*, 173,23: 7643-7649.
- Yoon, K. P. and S. Silver**, 1991. A second gene in the *Staphylococcus aureus cadA* cadmium resistance determinant of plasmid pI258. *J Bacteriol*, 173,23: 7636-7642.
- Zhu, W. H., G. C., B. J.-L. and J. J.**, 1997. Application des Réseaux Perceptron Multicouches au contrôle de la qualité des aliments par analyse sensorielle : Comparaison des résultats avec différentes méthodes d'analyse discriminante. *Société de statistique de France*.
- Zighed, D. A., J. P. Auray and G. Duru**, 1992. SIPINA : Méthode et logiciel.