



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة مtentouri
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : علم الكائنات الدقيقة

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des micro-organismes

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Les biosenseurs bactériens : Application à la surveillance environnementale.

Présenté par : Makhloufi Djihene

Le : 24/06/2025

Lemoufek Malak

Hanachi Amina Racha

Jury d'évaluation :

Président : BOUBEKRI Karima ((MCA – Uni. Frères Mentouri Constantine 1)).

Encadrant : BOULTIFAT Linda ((MCB – Uni. Frères Mentouri Constantine 1)).

Examinateur(s) : MERGOUD Lilia ((MAA – Uni. Frères Mentouri Constantine 1)).

Année universitaire

2024 - 2025

Remerciements

Avant toute chose, nous exprimons notre profonde gratitude à « **Bon Dieu** » Tout-Puissant, source de sagesse, de force et de patience, pour Sa guidance, Sa protection et les bénédictions qu'il nous a accordées tout au long de ce travail, et grâce auxquelles nous avons pu mener ce mémoire à terme dans les meilleures conditions.

Nous tenons à exprimer, notre profonde gratitude à notre encadrante, Mme BOULTIFAT Linda, pour son accompagnement précieux, sa disponibilité constante, ses conseils éclairés et sa bienveillance tout au long de ce travail. Son encadrement rigoureux et son soutien ont été essentiels à la réalisation de notre mémoire.

Nous adressons également nos sincères remerciements aux membres du jury, Mme BOUBEKRI Karima (MCA – Université Frères Mentouri Constantine 1) et Mme MERGOUD Lilia (MAA – Université Frères Mentouri Constantine 1), pour avoir accepté de faire partie de notre jury et d'évaluer notre travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à l'ensemble du corps enseignant, qui, tout au long de notre parcours universitaire, nous a transmis son savoir, son expérience et sa passion pour l'apprentissage. Leurs enseignements ont largement contribué à notre formation intellectuelle et au développement des compétences nécessaires à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous adressons nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont apporté leur aide, leur soutien et leurs encouragements, contribuant ainsi à la concrétisation de ce projet.

Dédicaces

À mes chers parents, Je n'aurais pu mener ce travail à bien sans votre amour inconditionnel, votre soutien sans faille et les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation. Vos mains m'ont porté, vos mots m'ont encouragé, et votre cœur m'a donné le courage d'avancer. Ce mémoire est une modeste preuve de ma gratitude pour tout ce que vous m'avez offert.

Ma sœur Lina et frère Nadim à vous, pour avoir toujours cru en moi, pour leurs mots justes aux bons moments, leur générosité sans limites et la présence inébranlable ont illuminé mon chemin. Merci d'être ma lumière.

A mon frère Zakaria ton rire a dissipé mes stress, ta présence a transformé mes doutes en défis. Tu n'as jamais été simplement un frère, mais un allié, un complice et parfois même mon premier public. Merci d'avoir été mon partenaire

À vous, mes petits trésors, mes anges, Zain et Manil, dont les sourires ont illuminé mes journées les plus longues et rempli ma vie d'une joie inestimable.

À mes cousines bien-aimées, dont l'amour, les encouragements et les sourires ont été une véritable source de motivation dans les moments de doute. Merci d'avoir toujours cru en moi.

À ma grande tante avec tout mon respect et mon affection, pour sa bienveillance, ses précieux conseils et sa présence inspirante tout au long de mon parcours.

À une personne très chère à mon cœur, merci pour ton écoute, ta bienveillance, ton soutien indéfectible, et ta présence constante tout au long de ce parcours.

Enfin, À mes binômes, Malak et Djihene avec qui j'ai partagé travail, efforts et fous rires. Merci pour votre soutien, votre implication et votre esprit d'équipe tout au long de cette aventure.

Racha

Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à **mes chers parents** dont le soutien, les encouragements et la confiance ont été une source inépuisable de motivation tout au long de mon parcours universitaire.*

*Merci à vous, **mon père**, pour votre sagesse, votre rigueur et votre exemple de détermination. Vous m'avez appris, souvent par l'exemple, à ne jamais baisser les bras face aux obstacles, à viser l'excellence sans jamais perdre mon humilité.*

*Merci à vous, **ma mère**, pour votre tendresse, votre écoute et votre force tranquille. Vous avez su m'offrir un foyer rempli de chaleur et de bienveillance, dans lequel j'ai puisé l'énergie nécessaire pour avancer, même lorsque le chemin semblait difficile.*

*Je remercie également **mes frères, mon beau-frère et mes sœurs**, ainsi que **mes neveux et nièces**, pour leur présence, leurs encouragements, les moments de joie partagés et leur compréhension tout au long de ce parcours exigeant.*

*À toutes **mes proches amis** qui j'aime, merci pour votre soutien discret mais précieux, vos conseils, et votre bienveillance qui m'ont accompagné tout au long de ce chemin.*

*Mes pensées reconnaissantes vont aussi à **mes binômes Racha et Djihene**, avec qui j'ai partagé des heures de travail, de réflexion et parfois de doutes, mais surtout une entraide précieuse et une belle complicité.*

Ce mémoire est aussi le fruit de votre présence dans ma vie. À chacun et chacune d'entre vous, je dis merci du fond du cœur.

Malak

Dédicaces

À mon adorable père, Radouane, Ton amour précieux, tes sacrifices discrets, ta force inaltérable, tes conseils qui ont orienté mon cheminement et ta confiance absolue en moi ont été ma plus grande source d'inspiration. Tu as bâti, sans bruit, les fondations de mes rêves.

Merci pour tout ce que tu es, et pour tout ce que tu as donné sans jamais rien attendre en retour

À ma chère maman, Farida, Ton amour inconditionnel, ta bienveillance sans limite et tes prières silencieuses ont été les piliers invisibles de chacun de mes pas.

Tu es l'héroïne discrète de mon histoire, celle dont la tendresse m'a sauvée plus d'une fois, dont le sourire m'a redonné courage et dont les bras ont su me protéger du tumulte de la vie. Un seul mot ne suffit pas pour te remercier, et mille mots ne suffisent pas pour te dire Je t'aime.

À mes frères bien-aimés, Raouf et Wassim, Vous avez été mes guides quand le doute m'assaillait, mes fous rires dans les nuits de stress, et cette petite voix qui me soufflait : 'Continue, tu en es capable !' Merci pour votre amour votre présence et vos encouragements qui m'ont porté plus loin que je ne l'imaginais.

À Racha et Malak, le dream team qui transformait les galères en souvenirs drôles, les stress en défis, et les nuits blanches en veillées mémorables. Je repars avec mon diplôme et la certitude que nos chemins se croiseront encore, parce que certaines rencontres sont juste trop précieuses pour s'arrêter là.

À ma promo de BMM, Vous n'êtes pas seulement des camarades de promo, vous êtes devenus des sœurs et des frères de cœur, merci d'avoir transformé ce parcours académique en une aventure précieuse et inoubliable.

Ce mémoire est aussi dédié à mes amis, ceux qui m'ont compris sans mots, apporté de la joie dans les moments stressants et soutenu dans les journées difficiles. Merci pour votre présence et vos encouragements.

Djihene

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations et acronymes	i
Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux.....	v
Résumés	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOSENSEURS BACTÉRIENS.	
1. Historique	3
2. Principe de la bio-détection par un biosenseur.....	4
3. Caractéristiques des biosenseurs	5
3.1. Sélectivité.....	5
3.2. Sensibilité	5
3.3. Reproductibilité	6
3.4. Exactitudes	6
3.5. Limite de détection.....	6
3.6. Temps de réponse	6
4. Classification des biosenseurs.....	6
4.1. Selon le type de bio-récepteur.....	6
4.1.1. Biosenseurs utilisant des biomolécules.....	6
4.1.2. Biosenseurs à cellule entières.....	8
4.2. Selon le type de transducteur.....	9
5. Définition des biosenseurs bactériens.....	11
6. Composition et mécanisme d'action des biosenseurs bactériens	11
6.1. Composition	11

6.1.1. Hôte bactérien.....	11
6.1.2. Bio-récepteur.....	11
6.1.3. Système de rapporteur.....	11
6.1.4. Transducteur.....	11
6.1.5. Processeur des singaux.....	12
6.2. Mécanisme d'action des biosenseurs bactériens.....	12
7. Domaines d'application des biosenseurs bactériens	13
7.1. Application dans l'industrie agroalimentaire	13
7.2. Application dans le domaine clinique	13
7.3. Application à la surveillance environnementale.....	14
7.3.1. Application dans le développement durable.....	14
7.3.2. Détection des métaux lourds et polluants.....	15

CHAPITRE II. MÉTHODES DE CONCEPTION DES BIOSENSEURS BACTÉRIENS APPLIQUÉS À LA SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE.

1.Introduction	17
2. Sélection de la souche bactérienne.....	17
3.Conception génétique des biosenseurs bactériens.....	18
3.1. Le promoteur.....	18
3.2. Le ribosome biding site (RBS).....	18
3.3. Le gène rapporteur.....	19
3.4. Le terminateur.....	20
4. Construction du plasmide.....	20
4.1. Le clonage d'ADN	20
4.2. Le système CRISPR-Cas.....	21

5. La transformation bactérienne.....	23
5.1. La transformation chimique.....	23
5.2. La transformation physique.....	24
5.3. L'électroporation.....	25
6. Méthode de culture et préparation.....	27
6.1. Conditions de culture.....	27
6.2. Validation et caractérisation.....	27
6.2.1. Test de sensibilité et spécificité.....	28
6.2.2. Optimisation des paramètres environnementaux.....	28
7. Fonctionnalisation des promoteurs métallorégulés des biosenseurs bactériens.....	29
8. Déploiement des biosenseurs bactériens <i>in vitro</i> et <i>in situ</i>	32
8.1. <i>In vitro</i>	32
8.2. <i>In situ</i>	34
9. Immobilisation des biosenseurs bactériens.....	38
10. Analyse et détection du signal.....	39
10.1. La bioluminescence.....	39
10.2. Microscopie à fluorescence.....	40
CHAPITRE III. PERSPECTIVES, INNOVATIONS ET DÉFIS DES BIOSENSEURS BACTÉRIENS.	
1. Perspectives.....	41
2. Innovations technologiques et approches multidisciplinaires.....	41
2.1. Intégration des nanotechnologies dans les biosenseurs bactériens.....	41
2.2. Intégration microfluidique (Lab-on-Chip)	42
3. Défis techniques et biologiques.....	43

3.1. Stabilité et conservation des bactéries biosenseurs.....	43
3.2. Risques de contamination croisée dans les applications <i>in situ</i>	44
3.3. Complexité des signaux et biodisponibilité des métaux.....	45
4. Enjeux éthiques, réglementaires et sécuritaires.....	46
4.1. Enjeux éthiques liés aux OGM.....	46
4.2. Enjeux réglementaires.....	47
4.3. Enjeux sécuritaires.....	48
4.3.1. Risques sanitaires.....	48
4.3.2. Risques environnementaux.....	48
CONCLUSION.....	49
Références bibliographiques.....	51
Annexes	

Liste des abréviations et acronymes

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Ag : Antigènes

ARN : Acide Ribonucléique

ARN pol : Acide Ribonucléique polymérase

AUG : Adénine - Uracile – Guanine

BGM : Bactéries Génétiquement Modifiées

CCD: *Charge-Coupled Device*

CRISPR-Cas: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated proteins*

DBO : Demande Biochimique en oxygène

DCO : Demande Chimique en oxygène

DL₅₀ : Dose Létale 50 %

DMAV : Acide Diméthylarsinate pentavalent

DsRed : *Red fluorescent protein*

EC50 : La concentration efficace 50 %

EFSA: *European Food Safety Authority*

ELISA: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GC-MS: *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GRAS: *Generally Recognized As Safe*

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

LB : *Luria-Bertani*

LOC : *Lab-on-Chip*

LOD : La limite de détection

MerR : la résistance au Mercure

MIT : *Massachusetts Institute of Technology*

MOPS : *Morpholino Propanesulfonic acid*

ODD : Objectifs de développement durable

OGM : Organisme Génétiquement Modifié.

Pars : Promoteur d'arsenic

PCB : Polychlorobiphényle

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PSA : Antigène prostatique spécifique

R² : Le coefficient de corrélation

RBS : *Ribosome Binding Site*

RLU : Unités relatives de luminescence

SD : *Shine-Dalgarno*

TCS: *Two Component System*

UE : Union Européenne

UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure1. Photo de Leland Clark.

Figure2. Schéma d'une électrode à oxygène pour la détection electrochimique.

Figure3. Schéma explicatif du principe d'un biosenseur.

Figure4. Représentation schématique des différents biorécepteurs.

Figure5. Schéma explicatif de la méthode d'amplification d'ADN.

Figure6. Schéma représentant un plasmide clone.

Figure7. Schéma représentant les étapes de la transformation artificielle chimique.

Figure8. Schéma représentant les étapes de la transformation artificielle physique.

Figure9. Mécanisme de l'électroporation.

Figure10. Principe de fonctionnement d'un biosenseur bactérien fluorescent pour la détection de polluants dans l'eau.

Figure11. Courbe de la concentration en ions mercure, obtenue en mesurant l'intensité de fluorescence sur une période de 3 heures.

Figure12. Photos de la fluorescence produite par les biosenseurs après exposition à différentes concentrations de mercure.

Figure13. Détection et visualisation des biosenseurs bactériens par microscopie à fluorescence.

Figure14. Photo d'un système biohybride drone-bactéries.

Liste des tableaux

Tableau1.Comparaison entre le clonage Gibson et le clonage traditionnel pour la construction de biosenseurs bactériens.

Tableau2. Comparaison des méthodes de transformation bactérienne : chimique, physique et électroporation.

Tableau3. Systèmes de résistance et d'efflux des métaux lourds chez les bactéries (opérons et transporteurs associés).

Résumé

Les biosenseurs bactériens représentent une technologie innovante et prometteuse pour la surveillance environnementale. Ces dispositifs utilisent des bactéries vivantes, le plus souvent génétiquement modifiées, pour détecter et signaler la présence de polluants, de métaux lourds et d'autres substances nocives avec une haute sensibilité et spécificité, comparativement aux méthodes traditionnelles, offrant des solutions efficaces et respectueuses de l'environnement. Apparus dans les années 1980 avec l'introduction des gènes *lux*, ces biosenseurs ont bénéficié des progrès en biologie moléculaire et en génie génétique. Leur conception repose sur des techniques de transformation bactérienne et l'intégration de systèmes rapporteurs optimisés par des outils modernes comme le clonage Gibson ou CRISPR-Cas. Les biosenseurs bactériens fonctionnent en utilisant des bactéries équipées de gènes rapporteurs et de transducteurs leur permettant la conversion de la réponse biologique en un signal mesurable, tel que la fluorescence ou la bioluminescence, en réponse à un stimulus spécifique. Malgré leurs nombreux avantages, ils font face à des défis d'ordres techniques, environnementaux et réglementaires. Toutefois, l'intégration de nanotechnologies, de microfluidique et d'approches multidisciplinaires ouvre des perspectives prometteuses pour leur développement futur.

Mots clés : Biosenseurs bactériens, surveillance environnementale, bactéries génétiquement modifiées, détection des contaminants.

Abstract

Bacterial biosensors represent an innovative and promising technology for environmental monitoring. These devices use living bacteria, most often genetically modified, to detect and signal the presence of pollutants, heavy metals, and other harmful substances with high sensitivity and specificity, compared to traditional methods, offering effective and environmentally friendly solutions. Emerging in the 1980s with the introduction of lux genes, these biosensors have benefited from advances in molecular biology and genetic engineering. Their design relies on bacterial transformation techniques and the integration of reporter systems optimized by modern tools such as Gibson cloning or CRISPR-Cas. Bacterial biosensors operate by using bacteria equipped with reporter genes and transducers, allowing the conversion of the biological response into a measurable signal, such as fluorescence or bioluminescence, in response to a specific stimulus. Despite their numerous advantages, they face technical, environmental, and regulatory challenges. However, the integration of nanotechnologies, microfluidics, and multidisciplinary approaches opens promising perspectives for their future development.

Keywords: Bacterial biosensors, environmental monitoring, genetically modified bacteria, contaminant detection.

تمثل أجهزة الاستشعار الحيوية البكتيرية تكنولوجيا مبتكرة و واعدة للمراقبة البيئية. تستخدم هذه الاجهزه بكتيريا حية، و غالباً ما تكون معدلة وراثياً للكشف عن وجود الملوثات والمعادن الثقيلة وغيرها من المواد الضارة والإبلاغ عنها بحساسية وخصوصية عالية، مقارنة بالطرق التقليدية، مما يوفر حلولاً فعالة وصديقة للبيئة ظهرت هذه المحسسات الحيوية في الثمانينيات مع إدخال جينات ، وقد استفادت من التقدم في علم الأحياء الجزيئي والهندسة الوراثية. تصميمها يعتمد على تقنيات التحول البكتيري ودمج أنظمة التقارير المحسنة بواسطة أدوات حديثة مثل استنساخ جيبيسون أو كريسيبر-كاس تعمل أجهزة الاستشعار الحيوية البكتيرية باستخدام بكتيريا مزودة بجينات ناقلة ومحولات تتيح لها تحويل الاستجابة البيولوجية إلى إشارة قابلة للقياس مثل الفلورية أو الإضاءة الحيوية، استجابةً لمحفز محدد على الرغم من مزاياها العديدة، فإنها تواجه تحديات من الناحية التقنية والبيئية والتنظيمية ومع ذلك، فإن دمج النانو-تكنولوجيات والميكروـفلايديك والنهج متعددة التخصصات يفتح آفاقاً واعدة لتطورها المستقبلي.

الكلمات المفتاحية : المستشعرات الحيوية البكتيرية، المراقبة البيئية، البكتيريا المعدلة وراثياً، كشف الملوثات.

Depuis plusieurs décennies, la surveillance environnementale est devenue une préoccupation majeure en raison de l'augmentation des polluants dans l'air, des contaminations des sols, la présence de métaux lourds et de composés organiques toxiques dans les ressources hydriques. Cette situation représente une réelle menace pour la santé des écosystèmes et des populations. Pour cette raison, les défis environnementaux contemporains, exigent des outils de surveillance toujours plus performants et innovants puisque, les méthodes traditionnelles de détection et de surveillance, bien qu'efficaces, présentent souvent des limites en termes de sensibilité, de spécificité et de coût. Dans ce contexte, les biosenseurs bactériens émergent comme une technologie prometteuse, offrant des solutions innovantes pour une surveillance environnementale plus précise et plus efficace.

Les biosenseurs bactériens sont des dispositifs qui utilisent le plus souvent des bactéries génétiquement modifiées ou naturelles pour détecter et signaler la présence de substances spécifiques dans l'environnement. Ces dispositifs combinent la sensibilité et la spécificité des réactions biologiques avec la précision des techniques de détection modernes. Les bactéries, en tant qu'organismes vivants, peuvent réagir à une large gamme de stimuli environnementaux, ce qui les rend particulièrement adaptées à la surveillance de divers polluants et contaminants.

L'application des biosenseurs bactériens à la surveillance environnementale présente plusieurs avantages significatifs. Tout d'abord, ces dispositifs sont souvent plus sensibles et plus spécifiques que les méthodes traditionnelles, permettant une détection plus précise des contaminants. Ils peuvent aussi être utilisés pour une surveillance en temps réel et *in situ*, ce qui permet une réponse rapide et ciblée aux problèmes environnementaux. De plus, les biosenseurs bactériens sont généralement plus rentables et respectueux de l'environnement, car ils utilisent des organismes vivants et des processus biologiques naturels.

Cependant, malgré leurs nombreux avantages, les biosenseurs bactériens présentent également des défis. La stabilité et la durabilité des bactéries dans des environnements complexes peuvent être des problèmes, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour améliorer leur performance et leur fiabilité. De plus, l'intégration des biosenseurs bactériens dans les systèmes de surveillance existants nécessite des développements technologiques et des investissements supplémentaires.

Dans cette optique, ce mémoire propose une étude théorique approfondie des biosenseurs bactériens et leur application à la surveillance environnementale. Ce manuscrit est composé de

3 chapitres. Le premier, présente des généralités sur les biosenseurs, incluant les principales dates marquant leur découverte ainsi que leurs mécanismes de fonctionnement. Le second chapitre est consacré aux méthodologies de conception et d'utilisation spécifiques dans divers aspects de la surveillance environnementale. Enfin, le dernier chapitre aborde les perspectives d'évolution de ces dispositifs, en s'appuyant sur les innovations récentes et en analysant les défis techniques, biologiques et éthiques qu'ils soulèvent.

À travers cette étude, nous espérons contribuer à une meilleure compréhension des potentialités des biosenseurs bactériens et à leur utilisation optimale pour une surveillance environnementale plus efficace et plus durable.

Chapitre I

Généralités sur les biosenseurs bactériens

biosenseurs bactériens

sur les biosenseurs bactériens

1. Historique

L'histoire des biosenseurs remonte à 1953 avec le premier concept de « biocapteur » introduit par Leland Clark (Figure 1), qui développa un capteur ou senseur électrochimique utilisant une électrode à oxygène pour mesurer les variations de tension liées à la concentration d'oxygène dans le sang (Figure 2) [1]. Plus tard, en 1962, ses travaux, ont été adaptés pour mesurer la glycémie chez les patients [2]. Leland Clark a été connu comme le « père des biosenseurs » [3,4].

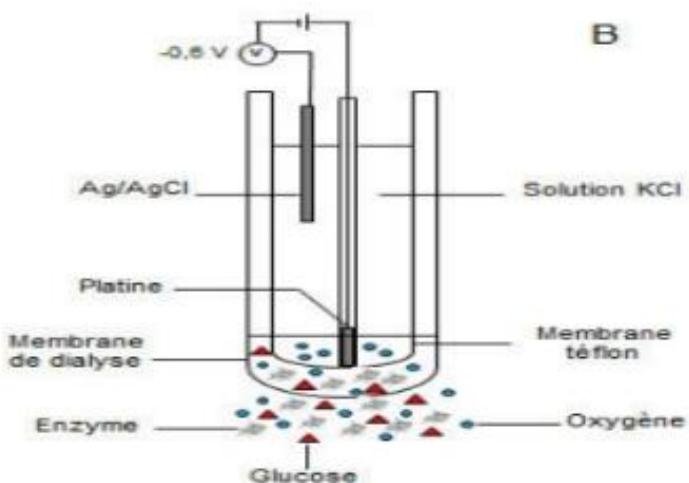


Figure 1. Photo de Leland Clark.

Figure 2. Schéma d'une électrode à oxygène pour la détection

électrochimique.

La découverte de la GFP (Green Fluorescent Protein) dans la méduse *Aequorea victoria* au début des années 1960, a révolutionné le domaine de la biologie [5,6]. L'introduction de la GFP comme marqueur fluorescent a conduit au développement de biosenseurs basés sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Ces biosenseurs permettent de détecter des interactions moléculaires ou des modifications conformationnelles en mesurant les variations de fluorescence entre deux protéines fluorescentes [7].

L'émergence des biosenseurs bactériens dans les années 1980 à 1990 a marqué une avancée majeure dans la surveillance environnementale. Grâce aux progrès du génie génétique, des micro-organismes ont été modifiés pour intégrer des gènes *lux* issus de bactéries bioluminescentes telles que *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* et *Photorhabdus luminescens*. Dès

1989, les premiers biosenseurs utilisant la bioluminescence ont été développés pour détecter la présence de polluants toxiques, notamment les métaux lourds et les hydrocarbures. L'association des gènes *lux* à des promoteurs constitutifs ou inductifs a permis d'évaluer la toxicité de divers environnements (eaux douces, eaux marines, sédiments, sols, eaux usées) en mettant en évidence des mécanismes de stress, de défense ou la présence de contaminants spécifiques. Le développement de ces outils repose sur la définition précise de leur champ d'application, élément clé pour une détection efficace et ciblée des polluants [8].

Depuis les années 2000, les biosenseurs bactériens se sont diversifiés et intégrés aux technologies environnementales, notamment pour détecter des polluants comme l'arsenic dans l'eau potable. Grâce aux avancées en biologie moléculaire, ils permettent une surveillance efficace de la qualité de l'eau et facilitent le traitement des contaminants. Leur rôle est crucial dans l'étude des écosystèmes aquatiques, en aidant à comprendre et anticiper les effets de la pollution, la raréfaction de l'eau et la propagation des pathogènes [9].

Aujourd'hui, l'élaboration des biosenseurs utilisant des technologies de pointe, comme Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Associated protein (CRISPR-Cas), a conduit à une détection plus rapide et précise. Ces biosenseurs trouvent leur application dans plusieurs secteurs, y compris la médecine, l'agriculture, le suivi environnemental et même l'exploration spatiale en vue de détecter la vie microbienne [10].

2.Principe de la bio-détection par un biosenseur

Le biosenseur est un outil d'analyse innovant et miniaturisé, dont le fonctionnement repose sur un mécanisme de détection biologique (Figure 3). Il est constitué d'un système intégrant une membrane et comprend deux éléments clés :

- Un élément biologique capable de reconnaître spécifiquement la cible à détecter,
- Un transducteur qui convertit l'interaction de reconnaissance en un signal physique mesurable.

L'élément biologique peut être, par exemple, un peptide, une enzyme, un acide nucléique, un anticorps ou un micro-organisme. Quant à la transduction, elle peut s'effectuer selon différents modes : optique, électrochimique, piézoélectrique ou calorimétrique [11].

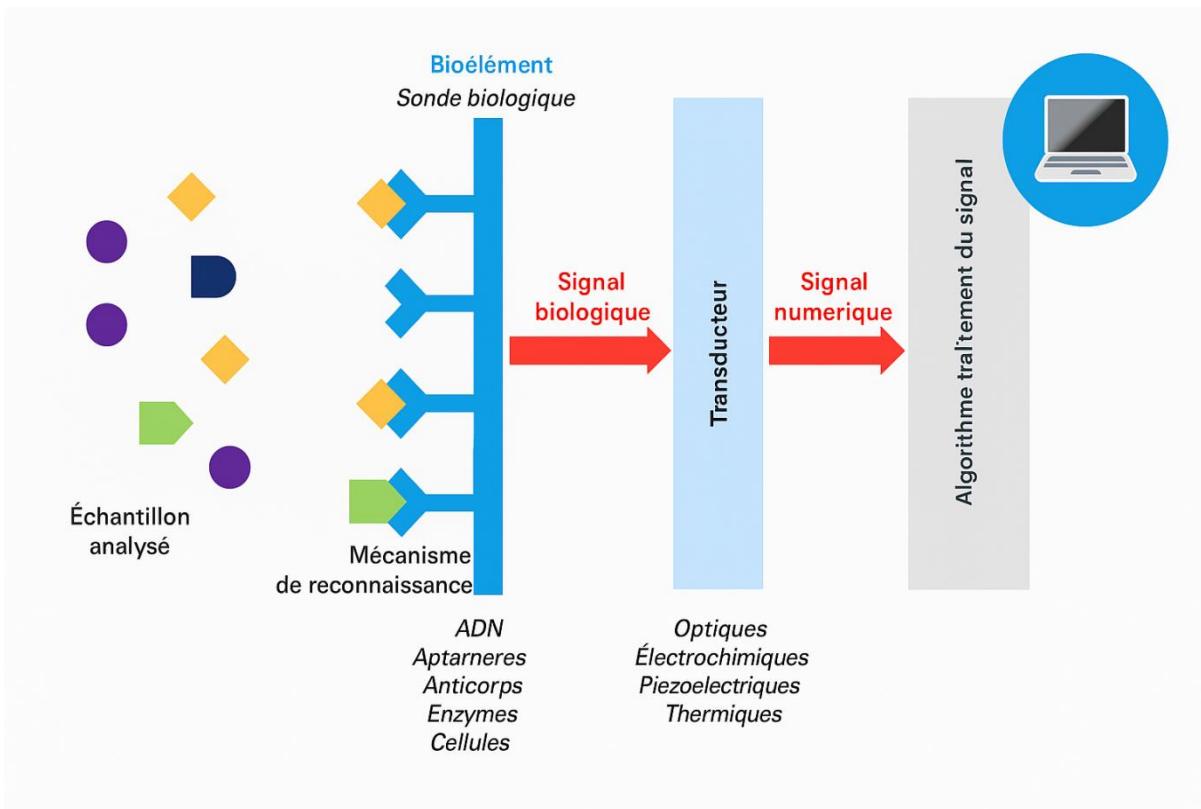


Figure 3. Schéma explicatif du principe d'un biosenseur [11].

3. Caractéristiques des biosenseurs

Il s'agit des caractéristiques permettant d'évaluer les performances d'un capteur et ses propriétés analytiques. Les critères les plus couramment utilisés sont les suivants :

3.1. Sélectivité

Il s'agit de la capacité du biosenseur à différencier plusieurs substrats. Ce paramètre dépend principalement de la composante biologique, bien que le choix du transducteur puisse également influencer la sélectivité [12].

3.2. Sensibilité

La sensibilité représente le rapport entre la variation de la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur mesurée. Il reflète la capacité du biosenseur à détecter de faibles changements dans la concentration du substrat [12].

3.3. Reproductibilité

La reproductibilité est l'un des paramètres les plus critiques. Il désigne la capacité du biosenseur à fournir des résultats très proches lors de mesures répétées d'une même quantité de la grandeur à mesurer [12].

3.4. Exactitude

L'exactitude correspond à la concordance entre le résultat de la mesure et la valeur réelle de la grandeur mesurée. L'écart entre ces deux valeurs est appelé erreur absolue [12].

3.5. Limite de détection

Limite de détection est la plus petite valeur de la grandeur mesurée que le biosenseur peut détecter de manière significative par rapport au bruit de fond. Elle définit la capacité du biosenseur à identifier des concentrations très faibles [12].

3.6. Temps de réponse

Le temps de réponse est un paramètre qui décrit la rapidité du biosenseur à réagir à des changements brusques de l'ampleur de mesure dans un intervalle très court. Il représente donc le laps de temps requis entre le changement de la grandeur à mesurer et l'émission du signal [12].

4. Classification des biosenseurs

4.1. Selon le type de bio-récepteur

La sélection du bio-récepteur est cruciale et doit être compatible avec le type de transducteur employé. Le bio-récepteur doit satisfaire plusieurs critères, tels que : la longévité, la simplicité d'immobilisation, l'absence d'altération due au processus d'immobilisation, la spécificité, et la sensibilité de la réponse aux analytes ciblés [13].

4.1.1. Biosenseurs utilisant des biomolécules

Les biosenseurs moléculaires sont des dispositifs largement utilisés pour identifier des molécules ou des ions spécifiques en solution et mesurer leur concentration. Leur

fonctionnement repose sur la détection d'une réaction biochimique entre un ligand et un récepteur, qui peut être une protéine ou une enzyme.

A / Les biosenseurs à base d'acides nucléiques (ADN et ARN) : les bio-récepteurs, en particulier ceux basés sur l'ADN/ARN, jouent un rôle clé dans le développement des puces à ADN/ARN. Ces dispositifs sont utilisés pour détecter des substances toxiques, des toxines ou des organismes pathogènes, tels que les bactéries alimentaires. Leur fonctionnement repose sur le principe d'hybridation, où des fragments d'ADN/ARN complémentaires (généralement de moins de 60 bases) se lient à des séquences immobilisées sur la puce. Parfois, des molécules mimant cette hybridation sont également employées [13]. L'utilisation de séquences d'ADN comme bio-récepteurs sur ces puces suscite un intérêt croissant en raison de leur potentiel dans divers domaines. Les biosenseurs d'ADN ou biopuces (microréseaux d'ADN) représentent une technologie innovante qui exploite l'appariement spécifique de deux oligonucléotides complémentaires. Cette approche permet non seulement d'identifier des séquences génétiques, mais aussi de détecter des mutations génétiques [14].

B / Les biosenseurs enzymatiques : historiquement, les enzymes ont été les premiers bio-récepteurs étudiés et restent, encore aujourd'hui, les éléments biologiques les plus couramment utilisés pour la conception de biosenseurs. Elles présentent plusieurs avantages, notamment la possibilité de modifier leurs propriétés catalytiques et leur spécificité en fonction des substrats, par exemple en ajustant la structure de leurs sites actifs [14].

Cependant, leur utilisation comporte certaines limites. Parmi celles-ci figurent un coût élevé de purification, une spécificité insuffisante pour distinguer des polluants appartenant à une même famille (par exemple, la détection différenciée des métaux lourds dans les eaux polluées), ainsi qu'une stabilité limitée qui les rend souvent inadaptées à une utilisation *in situ* [15].

Malgré ces contraintes, les enzymes sont employées dans une grande variété de domaines. Leur application la plus connue reste la création du biosenseur à glucose, basé sur l'utilisation du glucose oxydase. Cette innovation a marqué un tournant dans le développement des biosenseurs et demeure une référence dans le domaine [2].

C / Les biosenseurs immunologiques : les biosenseurs utilisant des anticorps (Ac) comme bio-récepteurs suscitent un intérêt majeur, notamment pour la détection immunologique directe, c'est-à-dire sans recourir à des molécules marquées. Le développement d'une méthode basée sur l'interaction antigène-anticorps (Ag-Ac) repose sur la capacité à mesurer un signal physique généré par la formation du complexe immun. Trois principales techniques de détection sont utilisées : optique, piézoélectrique et électrochimique [14].

Les anticorps, employés dans les immunocapteurs, offrent une plus grande polyvalence que les biosenseurs enzymatiques. Ils se lient de manière spécifique à des polluants individuels ou à des familles de polluants, avec une large gamme d'affinités. Cependant, leur utilisation est limitée par la complexité de leur conception et le besoin de réactifs spécialisés pour chaque biosenseur développé (Figure 4) [13,14].

Parmi les applications les plus connues, le test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) est largement utilisé. Ce test permet de détecter la présence de protéines, anticorps ou antigènes, et constitue une référence dans le domaine de la détection immunologique [14].

4.1.2. Biosenseurs à cellule entières

Les biosenseurs à cellules entières utilisent des cellules vivantes, telles que des bactéries, en tant qu'éléments sensibles. Ces cellules sont choisies pour leur capacité à produire des enzymes ou des protéines spécifiques, régulées par des éléments génétiques connus. Lorsqu'elles sont exposées à des substances chimiques cibles, des promoteurs génétiques sont activés, ces substances sont été détectées à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Ces systèmes de reconnaissance, très spécifiques, sont particulièrement utiles pour évaluer la toxicité, la biodisponibilité, et parfois même la bio-accessibilité de contaminants environnementaux tels que les métaux lourds, les hydrocarbures, les composés aromatiques, les dérivés chlorés ou les pesticides [15].

La réponse cellulaire à ces contaminants peut se manifester à l'échelle de la cellule par des changements de forme, de taille, de couleur ou de mobilité, ou à l'échelle moléculaire par l'activation de gènes promoteurs et la production de protéines spécifiques. En exploitant ces mécanismes, des manipulations génétiques permettent de modifier les cellules pour qu'elles génèrent des signaux luminescents ou fluorescents en présence des contaminants cibles. Ces

biosenseurs à cellules entières sont plus robustes que les biosenseurs traditionnels, car les cellules sont des systèmes flexibles, autonomes sur le plan énergétique et capables de s'auto-renouveler. Ils sont également moins sensibles aux perturbations ou aux interférences externes [15].

Les avancées en imagerie et en spectroscopie de fluorescence permettent d'analyser la réponse de ces biosenseurs à l'échelle d'une population cellulaire (par spectrofluorimétrie) ou d'une cellule individuelle (par microscopie de fluorescence). Différents systèmes d'imagerie sont ainsi utilisés pour visualiser et quantifier les réactions de bioluminescence et de chimioluminescence, offrant ainsi des outils puissants pour la détection et l'analyse des contaminants environnementaux [16].

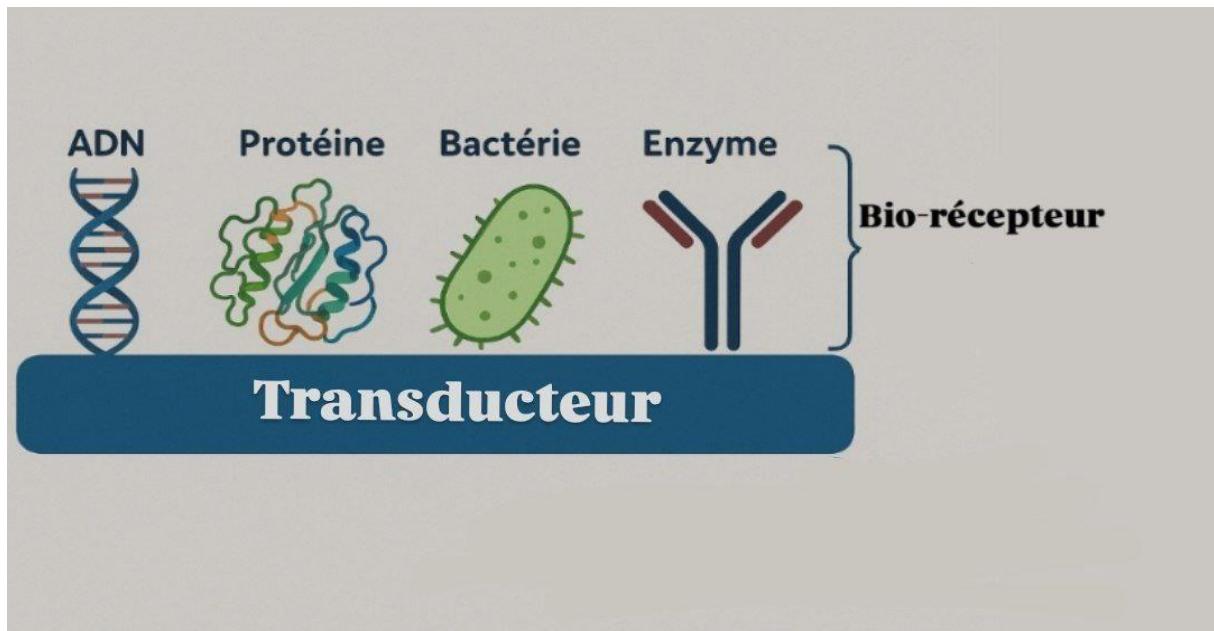


Figure 4. Représentation schématique des différents biorécepteurs [17].

4.2. Selon le type de transducteur

Les biosenseurs reposent sur l'utilisation de différents types de transducteurs, qui jouent un rôle central dans leur conception. La nature de ces transducteurs, variable selon les dispositifs, constitue souvent un critère de classification des types de biosenseurs. Parmi les biosenseurs microbiens, on distingue notamment :

A / Tansducteur optique : les transducteurs optiques permettent de réaliser diverses mesures, telles que :

- La bioluminescence : est un phénomène observé chez certaines bactéries, comme *Vibrio fischeri*, *Escherichia coli* ou *Phosphobacterium phosphoreum*, qui ont la capacité naturelle de produire de la lumière. L'intensité de cette luminescence peut varier en présence de composés toxiques, offrant ainsi un indicateur sensible de leur présence. Cette variation est généralement mesurée à l'aide de luminomètres, dont la configuration est adaptée au biosenseur utilisé l'étude menée par Jouanneau *et al.* (2011), des souches d'*Escherichia coli* génétiquement modifiées ont été exploitées pour émettre de la lumière. Les perturbations de la bioluminescence induites par des métaux lourds ont été mesurées à l'aide d'un luminomètre capable de lire des microplaques contenant les bactéries immobilisées. Cette approche a permis une détection précise et sensible des contaminants [18].
- La fluorescence : est la lumière émise par un composé à une longueur d'onde spécifique après avoir été excité par une lumière de longueur d'onde plus courte. Ce système de transduction est très répandu dans la conception de biosenseurs en raison de sa simplicité de fabrication. Il existe deux principaux types de biosenseurs à fluorescence :

- Ceux exploitant la fluorescence de molécules intrinsèques aux organismes, comme le biosenseur à fluorescence chlorophyllienne développé sur *Chlorella vulgaris* [19].
- Ceux mesurant la transformation d'un substrat non fluorescent en un produit fluorescent (ou inversement), grâce au métabolisme du micro-organisme.

Ces approches permettent une détection sensible et spécifique, faisant de la fluorescence un outil polyvalent pour la création de biosenseurs.

-La colorimétrie : principalement utilisée dans les biosenseurs bactériens, repose sur la transformation d'un substrat chromogène en un produit coloré (ou l'inverse) grâce à l'action métabolique d'une enzyme ou d'un organisme. La concentration du produit coloré est ensuite déterminée par des méthodes optiques, telles que la photographie suivie d'une analyse de l'intensité de la couleur à l'aide de logiciels comme ImageJ, ou par spectrophotométrie. Cette méthode offre une approche simple et efficace pour la détection et la quantification de substances cible [19].

B / Transducteur électrochimiques : les transducteurs électrochimiques permettent plusieurs types de détection, tels que : La pile à combustible microbienne qui transforme l'énergie chimique produite par des bactéries en énergie électrique [20]. Toute modification du métabolisme bactérien ou de la consommation de substrat peut entraîner une variation de l'énergie électrique générée par la biopile à combustible,l'ampérométrie,la voltamétrie cyclique, La conductimétrie et la potentiométrie [16].

5. Définition des biosenseurs bactériens

Les biosenseurs bactériens sont des instruments analytiques qui utilisent des bactéries génétiquement modifiées pour repérer des composés spécifiques et produire des signaux mesurables. Ces dispositifs exploitent les mécanismes de détection naturels des bactéries, adaptés pour produire des signaux tels que la fluorescence, la luminescence ou les signaux électrochimiques en réponse à des molécules cibles. En règle générale, un biosenseur bactérien est constitué d'un récepteur qui reconnaît la molécule cible et d'un système de communication qui transforme cette détection en un signal détectable [21].

6. Composition et mécanisme d'action des biosenseurs bactériens

6.1. Composition

Les biosenseurs bactériens sont constitués de divers composants essentiels qui les habilitent à identifier des analytes précis et à produire des signaux quantifiables :

6.1.1. Hôte bactérien : habituellement, on utilise des bactéries génétiquement altérées comme *Escherichia coli*, grâce à leur génome clairement défini et à leur manipulation aisée. Ces bactéries fonctionnent comme un élément d'identification biologique [21].

6.1.2. Bio-récepteur : une molécule présente dans la cellule bactérienne qui identifie des substances spécifiques ciblées (toxines, polluants ou indicateurs de maladie). Cela peut faire référence à des récepteurs bactériens naturels ou à des protéines altérées, élaborées pour s'associer à des analytes particuliers [21].

6.1.3. Système de rapporteur : un gène indicateur est incorporé au génome de la bactérie afin de générer un signal quantifiable lors de l'identification de la molécule cible. Les systèmes de rapport couramment utilisés incluent les protéines fluorescentes comme la GFP, les enzymes luminescentes telles que la luciférase ou les méthodes électrochimiques [21].

6.1.4. Transducteur : le transducteur transforme la réaction biologique en un signal physique comme la lumière ou la fluorescence qui peut être quantifié à l'aide d'instruments externes (microscopie à fluorescence, luminomètre et caméra CCD) [22].

6.1.5. Processeur de signaux : ce dispositif analyse et évalue le signal produit par le transducteur pour une étude plus approfondie [22].

6.2. Mécanisme d'action des biosenseurs bactériens

Les biosenseurs bactériens fonctionnent grâce à un mécanisme dans lequel les cellules bactériennes sont génétiquement modifiées pour reconnaître et répondre à des molécules ou des conditions spécifiques on a :

- a. Mécanisme de reconnaissance : les bactéries possèdent naturellement des mécanismes de détection, tels que les systèmes à deux composants (TCS) (Annexe 1), qui peuvent être réutilisés pour la biodétection. Ces systèmes comprennent un récepteur qui se fixe sur une molécule cible, déclenchant ainsi une réponse [23].
- b. Transduction du signal : lors de la liaison, le récepteur déclenche une cascade transcriptionnelle. Cette cascade est destinée à générer un signal quantifiable, généralement par l'expression d'un gène rapporteur [24].
- c. Expression du gène rapporteur : le gène indicateur génère une réponse décelable, comme la fluorescence ou la bioluminescence, lorsqu'il est exposé à la molécule cible. Cette sortie (ce signal) fonctionne comme un indicateur de la présence de l'analyte [25].

7. Domaine d'application des biosenseurs bactériens

7.1. Application dans l'industrie agroalimentaire

L'industrie agroalimentaire développe activement des méthodes d'analyse rapides, fiables et économiques afin d'assurer la qualité et la sécurité des denrées alimentaires. Dans ce contexte, les biosenseurs représentent une solution innovante de surveillance en temps réel de paramètres clés tels que le pH, la température, l'humidité ou la teneur en oxygène, garantissant ainsi le respect des normes de qualité. Leur capacité à détecter rapidement des contaminants dangereux notamment les pesticides, les métaux lourds et les toxines contribue significativement à la maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments [26, 27, 28].

Plus particulièrement, les biosenseurs sont devenus des outils de choix dans la détection rapide des toxines et des bactéries pathogènes telles que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ou *Salmonella*, qui représentent une menace majeure pour la santé publique. En effet, les infections alimentaires causées par ces agents seraient responsables d'environ 40 % des 50 millions de décès annuels attribués aux maladies infectieuses dans le monde. Grâce à leur haute spécificité et sensibilité, ces dispositifs permettent d'identifier les agents pathogènes en quelques minutes seulement, souvent sans préparation préalable de l'échantillon [29].

7.2. Applications dans le domaine clinique

La recherche menée par Liu *et al.* (2025), explore les progrès récents en matière de biosenseurs bactériens et leurs applications innovantes dans le domaine médical. Grâce à l'ingénierie génétique et à la biologie synthétique, des bactéries telles que *Escherichia coli* ou *Salmonella typhimurium* ont été modifiées pour détecter des biomarqueurs spécifiques associés à des maladies humaines, transformant ces signaux en réponses mesurables (bioluminescence, fluorescence, etc.). Les biosenseurs bactériens offrent des perspectives novatrices, notamment dans la détection du cancer et la surveillance du diabète. Dans le cas du cancer, certaines souches bactériennes comme *E. coli* Nissle 1917 et *Salmonella* ont été génétiquement modifiées pour cibler le microenvironnement tumoral, où elles détectent des biomarqueurs tels que le lactate ou les conditions d'hypoxie caractéristiques des tissus cancéreux. Ces bactéries expriment des gènes rapporteurs (tels que *luxCDABE* ou *lacZ*) produisant des signaux bioluminescents ou colorimétriques, permettant ainsi une détection non invasive de métastases, notamment hépatiques, par simple analyse urinaire. Concernant le diabète, des biosenseurs ont

étés conçus pour détecter le glucose dans les urines, en réponse à l'hyperglycémie. Par exemple, *E. coli* a été programmée pour exprimer des protéines fluorescentes sous le contrôle d'un promoteur sensible au glucose, encapsulée dans des billes de gel assurant sa stabilité et sa sécurité. Ce système a montré une sensibilité élevée (88,9 %) et une spécificité de 96,3 % pour la détection de la glycosurie chez les patients diabétiques. Ces dispositifs représentent une alternative économique et non invasive aux méthodes classiques, particulièrement adaptée au suivi personnalisé et à la télésurveillance dans les milieux à ressources limitées [30].

7.3. Application à la surveillance environnementale

7.3.1. Application dans le développement durable

Les biosenseurs sont des dispositifs innovants capables de détecter avec précision les impuretés présentes dans l'air, l'eau et le sol. Leur conception repose sur l'intégration d'éléments biologiques sensibles (enzymes, bactéries, anticorps, ADN, etc.) à des systèmes de détection physico-chimiques. Grâce à leur faible coût, leur simplicité d'utilisation, l'absence de matériel complexe, leur portabilité et leur capacité à fonctionner *in situ*, ils constituent une solution idéale pour la surveillance environnementale, en particulier dans les pays en développement où les ressources sont limitées. Par exemple, des biosenseurs portables ont été conçus pour détecter l'arsenic ou le plomb dans l'eau potable, ce qui permet d'identifier rapidement des menaces sanitaires majeures [31,32]. Ces dispositifs contribuent directement à la réalisation de plusieurs Objectifs de Développement Durable (ODD), notamment l'ODD 6, l'ODD 12, l'ODD 13, l'ODD 14 et l'ODD 15 (Annexe2). Ils sont utilisés pour surveiller la pollution dans les rivières, détecter des contaminants multiples (métaux lourds, pesticides, agents pathogènes), évaluer la toxicité globale de l'eau à travers des indicateurs tels que la DBO (Demande biochimique en oxygène) et la DCO (Demande chimique en oxygène), et ainsi prévenir les effets de l'eutrophisation [33, 34]. Dans les milieux agricoles, les biocapteurs permettent d'assurer une agriculture durable (ODD 2), en contrôlant les résidus de pesticides ou de pathogènes dans les aliments (comme *E. coli* ou *Salmonella*) et en optimisant l'utilisation d'intrants comme l'eau ou les engrains, ce qui contribue également à l'ODD 12. Du point de vue de la santé publique (ODD 3), ces capteurs sont utilisés dans le diagnostic rapide de maladies infectieuses, notamment dans les régions à faibles ressources, facilitant ainsi l'accès aux soins. Par ailleurs, le développement et la fabrication de biosenseurs stimulent l'innovation scientifique et technologique (ODD 9), en favorisant une industrialisation verte et responsable,

et en intégrant des matériaux durables et biodégradables dans une logique d'économie circulaire. Ainsi, les biosenseurs représentent une technologie clé, à l'interface entre la science, l'environnement et la société, contribuant activement à une transition vers un développement durable global [35,36].

7.3.2. Détection dans la détection des métaux lourds et polluants

La pollution par les métaux lourds, principalement issue d'activités industrielles comme l'exploitation minière ou la métallurgie, constitue un danger majeur pour la santé humaine et les écosystèmes. Des éléments comme le plomb (Pb), le chrome (Cr), l'arsenic (As) ou le mercure (Hg) sont particulièrement préoccupants en raison de leur forte toxicité et de leur résistance à la biodégradation. Ils s'accumulent facilement dans les sols, les eaux et les organismes vivants, rendant leur surveillance environnementale indispensable pour limiter les risques et préserver la biodiversité.

Parmi les méthodes de détection, les biosenseurs représentent une solution innovante et efficace. Ces dispositifs permettent d'identifier et de mesurer la présence de métaux lourds dans différents milieux comme l'eau, l'air ou les déchets. Les sondes ADN, par exemple, repèrent les ions métalliques grâce à la formation de structures spécifiques et stables au sein de l'ADN. D'autre part, les biosenseurs microbiens exploitent des bactéries génétiquement modifiées avec des gènes rapporteurs, capables de traduire une réponse biologique en signal mesurable. Ces outils facilitent le suivi de la qualité de l'eau et contribuent à une meilleure gestion des pollutions [35].

Chapitre II

Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

2015-2016

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

1. Introduction

Les biosenseurs bactériens offrent des solutions innovantes pour la détection et la quantification et la surveillance des polluants dans divers environnement, notamment le sol et l'eau. L'initiation du développement des bactéries génétiquement modifiés portant dans leur génome des gènes *lux* étrangers provenant des bactéries bioluminescentes (telles que *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* ou *Photorhabdus luminescens*) a eu lieu à la fin des années 1980. L'association des gènes *lux* avec des promoteurs constitutifs ou inductifs (engagés dans des stratégies d'homéostasie, de résistance et de réparation) ont permis d'évaluer la toxicité de divers échantillons issus d'environnements très différents [37].

La conception de biosenseurs de cette nature nécessite la détermination de plusieurs paramètres [38]. Il est primordial, en premier lieu, de déterminer le domaine d'application, c'est-à-dire le secteur d'étude dans lequel le biosenseur sera mis en œuvre. Par exemple, cela peut concerner l'identification d'un composé particulier ou d'un effet toxique général ou spécifique dans un milieu donné. Aussi, il est nécessaire de déterminer l'hôte et le système de régulation appropriés en fonction du domaine d'application. L'organisme hôte doit être en mesure de réagir de façon optimale aux conditions de l'environnement choisi (par exemple, le pH, la température, la salinité) et posséder un système de régulation approprié assez réactif pour répondre à une toxicité globale ou spécifique, ou à la présence d'un composé cible [39].

2. Sélection de la souche bactérienne

Le choix de la souche bactérienne constitue une étape déterminante dans la conception de biosenseurs. Il dépend de plusieurs critères, à la fois biologiques, génétiques, techniques et applicatifs. De manière générale, les souches sélectionnées doivent être non pathogènes, faciles à cultiver, et présentent une stabilité physiologique et génétique suffisante pour permettre un fonctionnement reproductible du biosenseur. Un paramètre essentiel est le temps de génération, qui influe directement sur la rapidité de réponse du système ; les bactéries à croissance rapide sont généralement privilégiées. La robustesse de la souche face aux variations environnementales (pH, température, salinité, contaminants) est également un facteur clé, notamment pour les applications *in situ* sur le plan génétique, les souches retenues doivent disposer d'un génome bien caractérisé et être compatibles avec les outils de génie génétique

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

disponibles (vecteurs, promoteurs, systèmes d'expression, etc.). Cela permet l'introduction ciblée de circuits de détection, tels que les systèmes de bioluminescence ou de fluorescence, tout en limitant les interférences métaboliques.

Enfin, la spécificité de réponse à l'analyte ciblé, qu'il s'agisse d'un métal, d'un polluant organique ou d'un perturbateur endocrinien, oriente souvent le choix vers des souches possédant des régulateurs naturels ou des capacités d'induction compatibles avec les objectifs du biosenseur.

Ainsi, plusieurs genres bactériens sont régulièrement utilisés selon les besoins (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio* ...) [8,40].

3. Conception génétique des biosenseurs bactériens

Une fois la souche sélectionnée, il est nécessaire d'identifier les gènes et les promoteurs spécifiques qui répondront à la substance cible. Cela peut impliquer :

3.1. Le Promoteur

Le promoteur est un site sur l'ADN d'une centaine de bases, peut être défini comme ça a été reporté par Weis and Reinberg (1992) : « La plus petite unité nécessaire et suffisante à l'initiation de la transcription *in vitro* par l'ARN pol II et les facteurs généraux de transcription ». Un promoteur spécifique au métal est un type de promoteur dont l'activité est contrôlée par la présence ou l'absence d'ions métalliques. Ces régulateurs sont fréquemment gérés par des protéines métalliques qui identifient la teneur en métaux (comme le fer ou le zinc) et ajustent l'expression du gène en fonction de cette concentration [41]. Par exemple, chez certaines bactéries, des opérons codant pour des métallophores (molécules de capture de métaux) sont sous le contrôle de promoteurs sensibles à la concentration en métaux, via des répresseurs comme Zur (pour le zinc) ou Fur (pour le fer) [42].

3.2. Le ribosome binding site (RBS)

Le RBS (Ribosome Binding Site), ou Shine-Dalgarno (SD), est une séquence d'ARN brève positionnée avant le codon de départ AUG (Adénine - Uracile – Guanine) sur l'ARN

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

messager, qui agit comme un point d'attachement pour le ribosome afin de commencer la traduction. Cette région s'associe à une zone fortement préservée et riche en pyrimidine de l'ARNr 16S. La séquence RBS est cruciale pour surveiller l'efficacité de l'expression des protéines. L'association entre le promoteur et la RBS est employée pour ajuster précisément l'expression d'un gène [43].

3.3. Le gène rapporteur

Les gènes rapporteurs jouent un rôle central dans la conception des biosenseurs bactériens, en permettant la transduction de signaux biologiques en réponses mesurables. Parmi eux, le système *luxCDABE*, issu des bactéries marines telles qu'*'Aliivibrio fischeri* ou *Photorhabdus luminescens*, est particulièrement prisé en raison de sa capacité à produire une bioluminescence autonome, sans ajout de substrat externe. Ce système encode un ensemble d'enzymes, dont la luciférase (codée par les gènes *luxA* et *luxB*), responsable de l'émission de lumière visible. Cette enzyme catalyse l'oxydation de substrats intracellulaires (FMNH_2 , acide gras) en présence d'oxygène, produisant ainsi une émission lumineuse détectable. La vitesse de renouvellement de la luciférase, variable selon l'espèce (par exemple, 100 ms pour *A. fischeri*), influence directement la dynamique du signal émis. Deux stratégies principales d'intégration des gènes *lux* sont couramment utilisées : l'insertion chromosomique, conférant une stabilité génétique mais une intensité de signal réduite, et la fusion transcriptionnelle via un plasmide, plus sensible grâce au nombre élevé de copies plasmidiques par cellule. Cette dernière approche est la plus répandue dans les dispositifs de détection. Les souches d'*Escherichia coli* porteuses de l'opéron *luxCDABE* sont ainsi utilisées pour détecter des contaminants environnementaux (métaux lourds, pesticides, solvants), dont la toxicité est corrélée à l'inhibition du signal bioluminescent [44, 45, 46, 47]. Par ailleurs, d'autres gènes rapporteurs comme *gfp*, permettant la visualisation de l'expression génique sous l'action de promoteurs inductibles, sont également exploités pour des applications en biosurveillance [48,49].

Avant leur insertion dans des vecteurs plasmidiques, ces gènes rapporteurs, sont généralement amplifiés par Polymerase Chain Reaction (PCR) afin d'amplifier de manière exponentielle la séquence cible d'ADN (dénaturation de l'ADN (à 95°C), l'hybridation d'amorces spécifiques (50-65°C) et l'elongation des nouveaux brins par une ADN polymérase thermostable (72°C) (Figure 5).

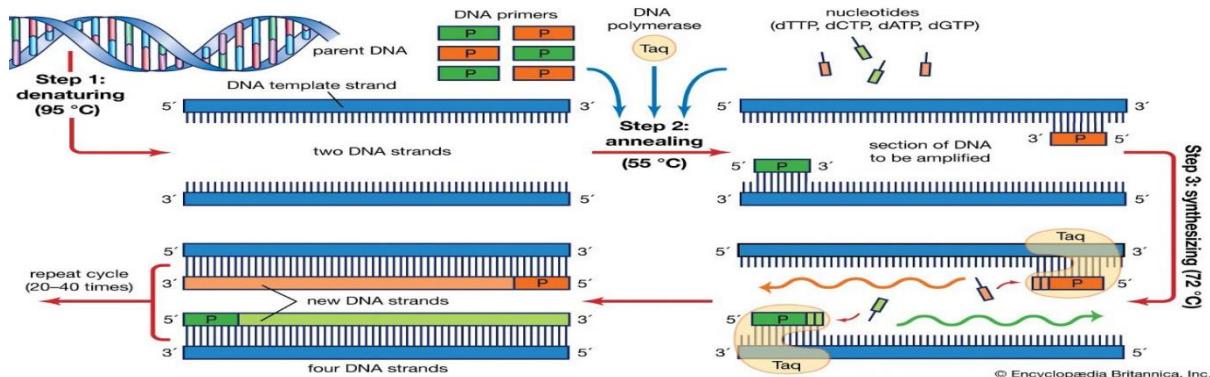


Figure 5. Schéma explicatif de la méthode d'amplification d'ADN.

3.4. Le terminateur

Chez les procaryotes, la fin de la transcription nécessite une séquence de terminaison. D'après les gènes, cette séquence active ou désactive le facteur protéique Rho.

4. Construction du plasmide

La construction du plasmide est une étape cruciale dans la conception des bactéries biosenseurs. Le plasmide est un vecteur génétique qui contient les gènes et promoteurs nécessaire pour la détection et la signalisation. Les étapes incluent :

4.1. Le clonage d'ADN

Le clonage Gibson est largement utilisé dans la conception des biosenseurs bactériens en raison de sa capacité à assembler rapidement plusieurs fragments d'ADN sans recours à des sites de restriction. Cette méthode est particulièrement adaptée pour intégrer des circuits génétiques complexes dans des plasmides bactériens. Par exemple, elle permet l'assemblage simultané de promoteurs, gènes rapporteurs (comme *gfp* ou *lux*), séquences régulatrices et gènes de détection spécifiques dans un seul vecteur. Grâce à cette approche, les chercheurs peuvent concevoir des biosenseurs sur mesure capables de répondre à une large gamme de signaux environnementaux ou biologiques. Le clonage Gibson facilite également la création des biosenseurs multiplexes, dans lesquels plusieurs modules génétiques coexistent et réagissent à différentes cibles (Figure 6) (Tableau 1) [50].

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

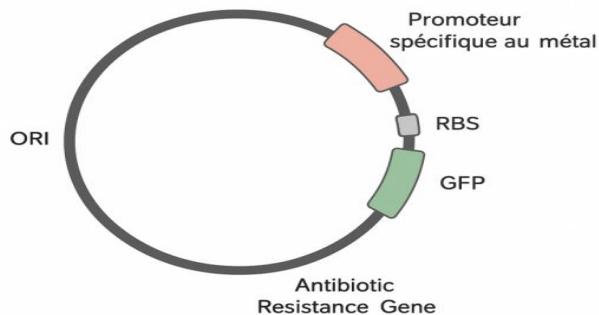


Figure 6. Schéma représentant un plasmide clone.

Tableau 1. Comparaison entre le clonage Gibson et le clonage traditionnel pour la construction des biosenseurs bactériens

Critères	Clonage Gibson	Clonage traditionnel (enzymes de restriction)
Principe	Assemblage par chevauchements (15-40 bp).	Utilisation de sites de restriction spécifiques.
Nombre de fragments	Jusqu'à 10 fragments.	Généralement 1-2 fragments.
Temps de réaction	30-60 min (une étape).	2-3 jours (digestion + ligation).
Efficacité	>90% avec overlaps optimisés.	30-70% selon les enzymes.
Coût	Élevé (enzymes propriétaires).	Modéré.
Applications en biosenseurs	Idéal pour circuits complexes (promoteurs+gènes rapporteurs).	Adapté aux constructions simples.
Avantages	- Pas besoin de sites de restriction. - Assemblage multi-fragments.	- Bonne spécificité. - Bien établi.
Limites	- Conception des overlaps critique. - Coût élevé.	- Limitations de sites de restriction.

4.2. Le système CRISPR-Cas

Le système CRISPR-Cas signifie « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » et « CRISPR-associated proteins », est un mécanisme de défense adaptatif (équivalent d'un système immunitaire) identifié chez les bactéries et les archées. Cela donne à ces micro-organismes la capacité de se défendre contre les infections virales en identifiant et en sectionnant des séquences particulières d'ADN ou d'ARN étrangers. Deux éléments essentiels constituent le fondement de ce système :

1- Les séquences CRISPR, qui gardent en mémoire les infections précédentes sous la forme de segments d'ADN viral.

2- Les protéines Cas, comme Cas9, Cas12 et Cas13, exploitent cette mémoire pour identifier et sectionner de manière très précise l'ADN ou l'ARN cible [51].

Le système CRISPR-Cas offre la possibilité de modifier avec précision et spécifiquement les génomes des organismes. Dans le domaine des biosenseurs, le système CRISPR-Cas est mis en œuvre pour apporter des changements dans des bactéries ou d'autres organismes modèles, dans le but d'optimiser leur aptitude à identifier des substances particulières. Par exemple, la technique CRISPR-Cas pourrait permettre l'insertion des gènes fluorescents ou des gènes rapporteurs, dont le comportement modifie en présence d'une substance polluante spécifique.

Cette méthode peut également accroître la sensibilité des cellules hôtes face aux stimuli environnementaux, optimisant de ce fait les performances des biosenseurs.

Une recherche menée par Zhang *et al.* (2017), a démontré l'emploi du CRISPR afin de rendre des bactéries sensibles à l'arsenic contenu dans l'eau, par l'insertion d'un gène déclenchant une réaction fluorescente en présence de ce polluant [52].

Le clonage traditionnel, l'assemblage Gibson et CRISPR-Cas sont trois techniques complémentaires en ingénierie génétique pour concevoir des biosenseurs bactériens. Le clonage traditionnel, basé sur des enzymes de restriction et des ligases, permet l'insertion fiable de gènes dans des vecteurs plasmidiques, tandis que l'assemblage Gibson offre une méthode rapide et précise pour assembler simultanément plusieurs fragments d'ADN, utile pour des

circuits génétiques complexes. CRISPR-Cas, quant à lui, permet une édition génomique ciblée pour modifier l'expression des gènes de détection ou optimiser les fonctions du biosenseur. Ensemble, ces approches permettent de développer des bactéries génétiquement modifiées capables de détecter avec sensibilité et spécificité des polluants ou des agents pathogènes, illustrant leur importance en biologie synthétique appliquée aux capteurs biologiques [53].

5. La transformation bactérienne

Afin que la transformation se produise, les bactéries réceptrices doivent être dans un état appelé compétence. Sous certaines conditions environnementales, certaines bactéries peuvent naturellement développer une compétence. Toutefois, beaucoup d'autres bactéries ne deviennent pas naturellement compétentes, ou les conditions de ce processus restent encore à découvrir. Du fait de l'importance de cette transformation pour la biologie moléculaire, divers protocoles ont été élaborés pour rendre les cellules artificiellement compétentes lorsque les conditions de compétence naturelle restent indéterminées. Il existe 2 types de transformation :

5.1. La transformation chimique

La transformation chimique repose sur l'utilisation d'agents chimiques, principalement le chlorure de calcium (CaCl_2), qui agit en neutralisant les charges négatives de l'ADN et de la membrane bactérienne, facilitant ainsi l'adhésion de l'ADN à la surface cellulaire. Les bactéries, rendues compétentes par ce traitement, sont ensuite soumises à un choc thermique (généralement à 42 °C pendant quelques secondes), provoquant la formation temporaire de pores au niveau de la membrane plasmique par lesquels l'ADN recombiné peut pénétrer. Cette méthode est simple, peu coûteuse, et couramment utilisée pour la transformation de souches standards comme *Escherichia coli* (Figure 7) [54].

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

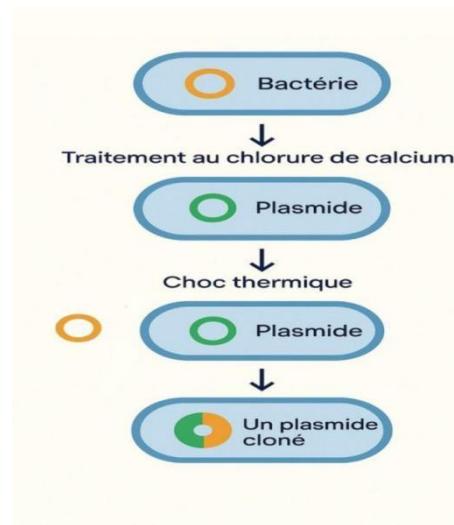


Figure 7. Schéma représentant les étapes de la transformation artificielle chimique.

5.2. La transformation physique

C'est une technique qui utilise un choc électrique de haute tension pour créer des pores transitoires dans la membrane bactérienne. Lorsqu'un champ électrique est appliqué brièvement, il perturbe l'organisation lipidique de la membrane, permettant à l'ADN recombiné d'entrer dans la cellule bactérienne (Figure 8) [55].

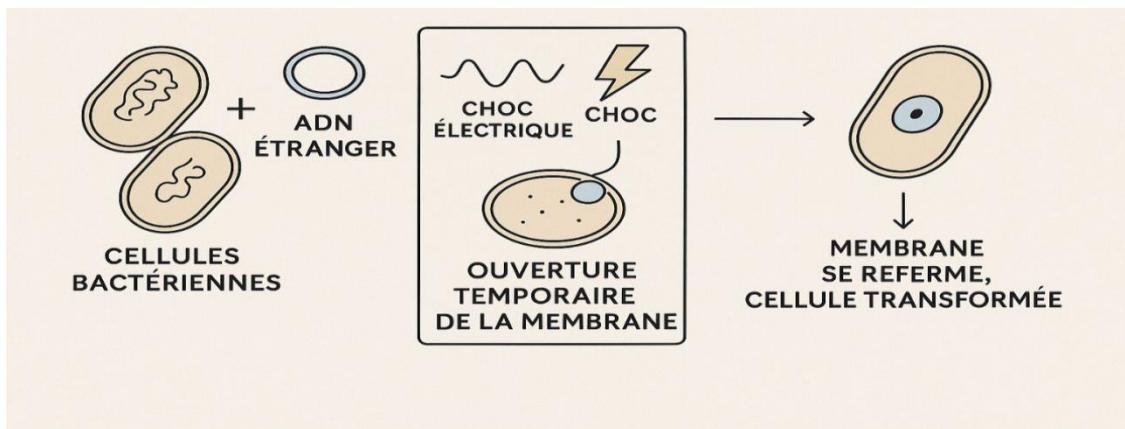


Figure 8. Schéma représentant les étapes de la transformation artificielle physique.

5.3. L'électroporation

L'électroporation constitue une méthode de transformation bactérienne particulièrement adaptée au développement des biosenseurs sensibles. Cette technique permet l'introduction efficace des plasmides porteurs de circuits génétiques détecteurs dans diverses souches bactériennes [56]. Le principe repose sur l'application d'un champ électrique pulsé induisant une perméabilisation transitoire de la membrane cellulaire, facilitant ainsi le transfert d'ADN exogène (Figure 9) [57].

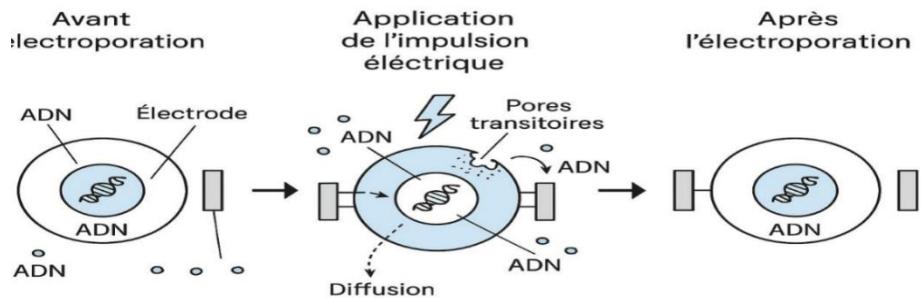


Figure 9. Mécanisme de l'électroporation.

Comparativement aux méthodes conventionnelles comme le choc thermique, l'électroporation présente un rendement supérieur, atteignant jusqu'à 10^{10} transformants par microgramme d'ADN [58]. Son principal avantage réside dans son applicabilité à des souches récalcitrantes telles que *Pseudomonas spp* ou *Bacillus spp*, fréquemment employées dans les biosenseurs environnementaux (Tableau 2) [56].

La réussite de la transformation repose sur l'optimisation des paramètres physiques incluant la tension (généralement 1,8 kV pour *Escherichia coli*), la résistance et la capacitance [57]. Ces paramètres doivent être ajustés en fonction des caractéristiques de la souche bactérienne et de la taille du plasmide. Une fois transformées, les bactéries expriment des systèmes rapporteurs (GFP ou luciférase) sous le contrôle des promoteurs inductibles, permettant la détection quantitative de contaminants spécifiques [56].

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

Cette méthode s'avère particulièrement pertinente pour l'intégration des biocapteurs dans des systèmes microfluidiques, où la reproductibilité et l'efficacité de transformation sont des paramètres critiques (Tableau 2) [57].

Tableau 2. Comparaison des méthodes de transformation bactérienne : chimique, physique et électroporation.

Critères	Transformation chimique	Transformation physique	Électroporation
Principe	Perméabilisation membranaire par CaCl_2 + choc thermique (42°C).	Application d'un choc électrique	Choc électrique pulsé créant des pores membranaires
Efficacité	10^5 – 10^7 transformants/ $\mu\text{g ADN}$.	10^7 – 10^8 transformants/ $\mu\text{g ADN}$.	10^8 – 10^{10} transformants/ $\mu\text{g ADN}$.
Type de force utilisé	Chimique +température.	Physique (choc électrique élevé).	Champ électrique très élevé.
Application en biosenseurs.	Clonage de base dans <i>E.coli</i> (ex : promoteurs GFP).	Souches non modèles (ex : <i>Bacillus</i> pour détection de toxines).	Biosenseurs haute sensibilité (ex : <i>Pseudomonas</i> pour métaux lourds).
Avantage	-Simple et peu coûteuse. - Idéale pour <i>E. coli</i> .	-Haute efficacité. -Rapide.	- Très Haute efficacité. -Large spectre de souches.
Inconvenant	-Limitée aux souches modèles. -Faible efficacité pour Gram+.	- Coût élevé. -Dommages cellulaires possibles.	-Optimisation nécessaire (tampon, tension). -Mort cellulaire si mal paramétré.

6. Méthodes de culture et préparation

6.1. Conditions de culture

La réussite de la détection avec des biosenseurs bactériens repose en grande partie sur les conditions de culture et le choix du milieu utilisé. Les bactéries hôtes sont généralement cultivées dans des milieux enrichis comme le LB (Luria-Bertani) (Annexe 3), qui favorisent une croissance rapide et une expression efficace des constructions génétiques contenant les gènes rapporteurs. Ce milieu est souvent supplémenté en antibiotiques (comme la kanamycine ou l'ampicilline) pour assurer la sélection des plasmides portés par les cellules transformées. Avant l'exposition aux échantillons, une pré-culture est réalisée à 37 °C avec agitation, puis diluée dans un volume plus important de milieu frais pour atteindre la phase exponentielle, moment où l'activité métabolique est optimale. Dans les expériences de détection, les bactéries sont ensuite exposées à des solutions contenant les analytes cibles (métaux lourds, toxines...) dans un milieu de détection. Celui-ci peut être un milieu pauvre en nutriments (type M9 minimal ou phosphate tamponné), afin de réduire le bruit de fond métabolique et d'améliorer la sensibilité du signal généré par le gène rapporteur (par exemple, *luxCDABE* pour la bioluminescence). Cette approche permet également d'éviter une croissance excessive de la bactérie durant la détection, ce qui pourrait masquer la réponse spécifique à l'analyte [47]. Par exemple, dans une étude récente Zhang *et al.* (2023), ont utilisé une souche *E. coli* porteuse du plasmide *pZntA-lux* pour détecter le cadmium et le plomb dans de l'eau de rivière. Les bactéries étaient cultivées dans du LB, puis transférées dans un milieu MOPS (Morpholino Propanesulfonic Acid) modifié sans glucose pour la phase de détection. Le signal bioluminescent était mesuré après 2 heures d'exposition, révélant une réponse dose-dépendante dès 0,1 µM de Cd²⁺ [59].

Ce protocole standardisé de culture et de détection *in vitro* permet non seulement d'assurer une reproductibilité expérimentale, mais aussi d'obtenir une réponse fiable, rapide et sensible aux contaminants cibles.

6.2. Validation et caractérisation

À l'issue de la phase de culture, des tests de validation sont réalisés afin d'évaluer la fonctionnalité des bactéries biosenseurs. Cette validation repose principalement sur deux paramètres clés : la sensibilité, qui reflète la capacité du biosenseur à détecter de faibles concentrations de l'analyte cible, et la spécificité, qui correspond à l'aptitude du système à répondre exclusivement à cette molécule.

6.2.1. Test de sensibilité et spécificité

-La sensibilité : le test de sensibilité consiste à exposer les bactéries à une gamme de concentrations croissantes de l'analyte cible, dans des conditions expérimentales standardisées. La réponse émise (ex. : bioluminescence via le système *luxCDABE*) est mesurée à l'aide d'un luminomètre ou d'un lecteur de microplaques, à intervalles réguliers.

La construction de la courbe dose-réponse permet de déterminer plusieurs paramètres :

- La limite de détection (LOD) : plus faible concentration produisant une réponse significativement supérieure au bruit de fond.
- La concentration efficace 50 % (EC50) : concentration induisant 50 % du signal maximal observé.
- Le coefficient de corrélation (R^2) de la courbe, qui renseigne sur la linéarité de la réponse dans une certaine plage de concentration [59,60].

-La spécificité : est ensuite évaluée en exposant les mêmes bactéries à des substances non cibles mais potentiellement présentes dans le milieu (par exemple, Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} dans le cas de la détection du zinc). L'absence de réponse significative à ces composés démontre la sélectivité du système.

Un facteur de sélectivité peut être défini comme le rapport entre le signal généré par la substance cible et celui induit par les substances non spécifiques. Une spécificité élevée est essentielle, notamment pour les applications environnementales où de nombreux polluants coexistent et peuvent interférer avec la détection [61].

6.2.2. Optimisation des paramètres environnementaux

Le bon fonctionnement des biosenseurs bactériens est étroitement lié aux conditions environnementales auxquelles les bactéries sont exposées. Ces paramètres influencent directement la viabilité cellulaire, l'expression des gènes rapporteurs et la qualité du signal de détection. Parmi les facteurs les plus déterminants, on retrouve la température, le pH, la composition du milieu, l'oxygénation, ainsi que la présence de substances interférentes.

Une température inadéquate peut ralentir ou inhiber le métabolisme bactérien, entraînant une production réduite de bioluminescence ou de fluorescence. Le pH du milieu affecte quant à lui la stabilité des protéines et l'activité des promoteurs sensibles utilisés dans les constructions génétiques, comme *pzntA* ou *rnb P1*. De plus, la concentration en nutriments joue un rôle crucial : un milieu trop riche peut masquer la réponse spécifique du biosenseur, tandis qu'un stress nutritif, dans certains cas, est volontairement exploité pour activer certains promoteurs, Notamment dans les biosenseurs non spécifiques [62].

L'oxygène est également un paramètre critique, en particulier pour les systèmes utilisant le gène *lux*, car la bioluminescence bactérienne dépend des réactions enzymatiques oxydatives. Un manque d'oxygène peut donc fausser les résultats en diminuant artificiellement le signal. Enfin, la présence d'autres polluants, des métaux en excès ou des substances toxiques, peut provoquer une inhibition non spécifique de l'activité cellulaire, rendant difficile l'interprétation des résultats.

Par exemple, dans une étude menée par Belkin, S. (2003) [63], il a été démontré que la réponse bioluminescente d'*E.coli* porteuse d'un plasmide porteur d'un gène *lux* était fortement réduite lorsque le pH passait de 7,0 à 5,5, et que l'absence d'agitation (réduction d'oxygène) entraînait une diminution de plus de 60 % du signal lumineux. Ainsi, pour garantir la fiabilité et la sensibilité des biosenseurs bactériens, il est essentiel de maîtriser et standardiser les conditions environnementales lors des expérimentations, notamment lors de leur utilisation en milieux réels où ces paramètres varient considérablement [62].

7. Fonctionnalisation des promoteurs métallorégulés des biosenseurs bactériens

Les biosenseurs cellulaires basés sur des bactéries génétiquement modifiées exploitent des systèmes naturels de régulation génique, adaptés pour détecter la présence de métaux

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

toxiques dans l'environnement. Un exemple représentatif est le système de résistance au mercure, impliquant la protéine régulatrice MerR, qui agit comme un interrupteur moléculaire. En l'absence d'ions (Hg^{2+}), MerR se fixe à la région opérateur-promoteur de gènes de défense et inhibe leur transcription (circuit « ouvert »). Lorsqu'elle détecte le mercure, sa conformation change, empêchant cette fixation, ce qui active l'expression de gènes codant des pompes d'efflux ou des protéines de séquestration (circuit « fermé ») [64]. En réponse à des environnements hostiles, notamment en présence de métaux lourds, les bactéries mettent en œuvre des stratégies de survie et activent des réponses cellulaires adaptées :

- a. Formation des biofilms : les bactéries s'assemblent en communautés encapsulées dans une matrice extracellulaire, réduisant ainsi la pénétration des métaux toxiques [65].
- b. Systèmes à deux composants (TCS) : ces mécanismes de détection et de signalisation permettent aux bactéries de réagir rapidement aux stress, dont la présence des métaux lourds [65].
- c. Séquestration intra-cytoplasmique par des protéines soufrées : les bactéries utilisent des protéines riches en cystéine, qui possèdent des groupements thiol (-SH), pour chélater et neutraliser les ions métalliques chalcophiles comme Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} , limitant ainsi leur toxicité directe dans le cytoplasme [66, 67, 68].
- d. Transformation enzymatique des métaux : certaines bactéries oxydent ou réduisent des métaux comme l'arsenic (As) ou l'antimoine (Sb), afin d'accroître leur innocuité.
- e. Contrôle passif de la diffusion des métaux : la paroi bactérienne, notamment ses couches polymériques externes, absorbe partiellement les ions métalliques, diminuant leur pénétration dans la cellule et leur potentiel toxique [69].
- f. Système d'efflux membranaires : les pompes d'efflux sont des protéines transmembranaires qui garantissent l'évacuation active des métaux hors du cytoplasme (exportent les métaux toxiques depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire). Elles représentent le mécanisme de résistance le plus répandu chez les bactéries et offrent une gestion dynamique de la concentration intracellulaire de métaux [69].

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

Parmi ces mécanismes, les systèmes d'efflux sont particulièrement utilisés dans les biosenseurs bactériens en raison de leur réponse rapide, contrôlable et reproductible. En couplant ces systèmes à des gènes rapporteurs luminescents, il est possible de détecter et de quantifier les métaux lourds dans un échantillon environnemental de manière sensible et fiable [70,71] (Tableau3).

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence la capacité de certaines bactéries à résister et à éliminer des métaux lourds présents dans des milieux contaminés. Par exemple, la souche *Stenotrophomonas rhizophila*, isolée de sols pollués par les métaux, a démontré une efficacité remarquable dans la biosorption du plomb (76,9 %) et du cuivre (83,4 %) à des concentrations élevées. L'analyse génomique de cette souche a révélé la présence de plusieurs gènes et opérons responsables de la résistance, tels que *czc*, *cop* et *mer*, ainsi que trois systèmes d'efflux (CDF, sRND, P-ATPase) permettant l'expulsion des ions métalliques hors de la cellule. De plus, des protéines spécifiques (thioredoxine, CutA, arsenate réductase) et des transporteurs ABC sont également impliqués dans les processus de détoxicification [65].

Tableau 3. Systèmes de résistance et d'efflux des métaux lourds chez les bactéries (opérons et transporteurs associés).

Abréviation	Nom complet	Fonction principale
Cop	Copper resistance operon.	Résistance au cuivre via des protéines de transport et chaperonnes dans le périplasme.
ABC	ATP-binding cassette transporters.	Famille de transporteurs membranaires utilisant l'ATP pour exporter les métaux toxiques.
sRND	Resistance-nodulation-cell division efflux system.	Systèmes d'efflux à large spectre pour métaux lourd et antibiotiques.
P-ATPase	P-type ATPase métal efflux system.	Pompe ATPase spécifique aux métaux pour l'expulsion de Cu^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} .

Ces constructions génétiques, une fois validées, ouvrent la voie à leur déploiement pour une

surveillance environnementale efficace et en temps réel.

8. Déploiement des biosenseurs bactériens *in vitro* et *in situ*

8.1. *In vitro*

Dans l'étude menée par Rooointan *et al.* (2015), un biosenseur bactérien a été conçu à partir d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) génétiquement modifiée pour détecter le mercure en solution aqueuse. Ce système utilise un plasmide recombinant (pUMERG), dérivé de pUC19, portant la séquence régulatrice *merR* ainsi que la région opérateur/promoteur inductible par le mercure, couplée au gène rapporteur *gfp*. En présence d'ions (Hg^{2+}), la protéine MerR active la transcription de *gfp*, conduisant à une émission fluorescente détectée par fluorométrie (excitation à 490 nm, émission à 530 nm). L'analyse de l'intensité de fluorescence, enregistrée après 3 heures d'exposition à différentes concentrations de mercure, a révélé que la réponse du biosenseur est optimale dans une plage comprise entre 10^{-8} M et 10^{-4} M. En dessous de 10^{-8} M, aucune fluorescence significative n'a été observée, vraisemblablement en raison de la répression transcriptionnelle exercée par MerR en absence de mercure. À l'inverse, à 10^{-4} M, l'expression de *gfp* diminue également, probablement à cause de la saturation du système régulateur et des effets cytotoxiques du mercure sur les cellules (Figure 11) (Figure 12). Il est important de noter que ces cellules biosensorielles ne sont jamais relâchées dans l'environnement : les échantillons d'eau sont prélevés sur le terrain puis analysés en laboratoire où ils sont mis en contact avec les bactéries dans des conditions strictement contrôlées (Figure 10). Cette stratégie garantit une détection sensible et spécifique du mercure tout en évitant la dissémination de microorganismes transgéniques, assurant ainsi la biosécurité et le respect des réglementations environnementales [72].

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

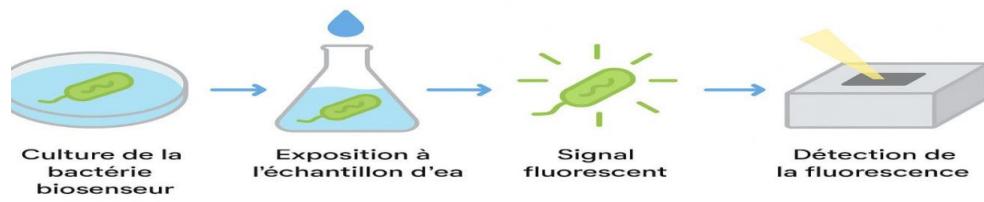


Figure10. Principe de fonctionnement d'un biosenseur bactérien fluorescent pour la détection de polluants dans l'eau.

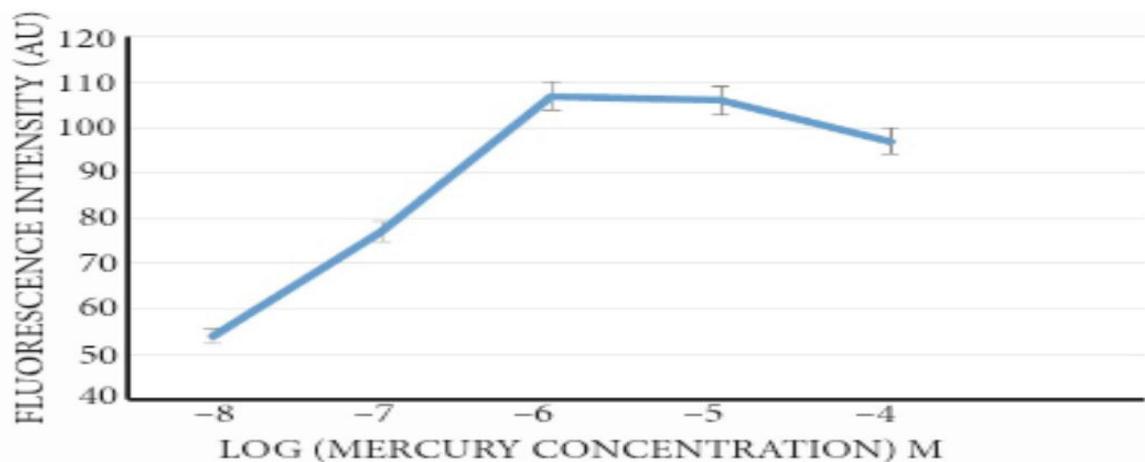


Figure11. Courbe de la concentration en ions mercure, obtenue en mesurant l'intensité de fluorescence sur une période de 3 heures [72].

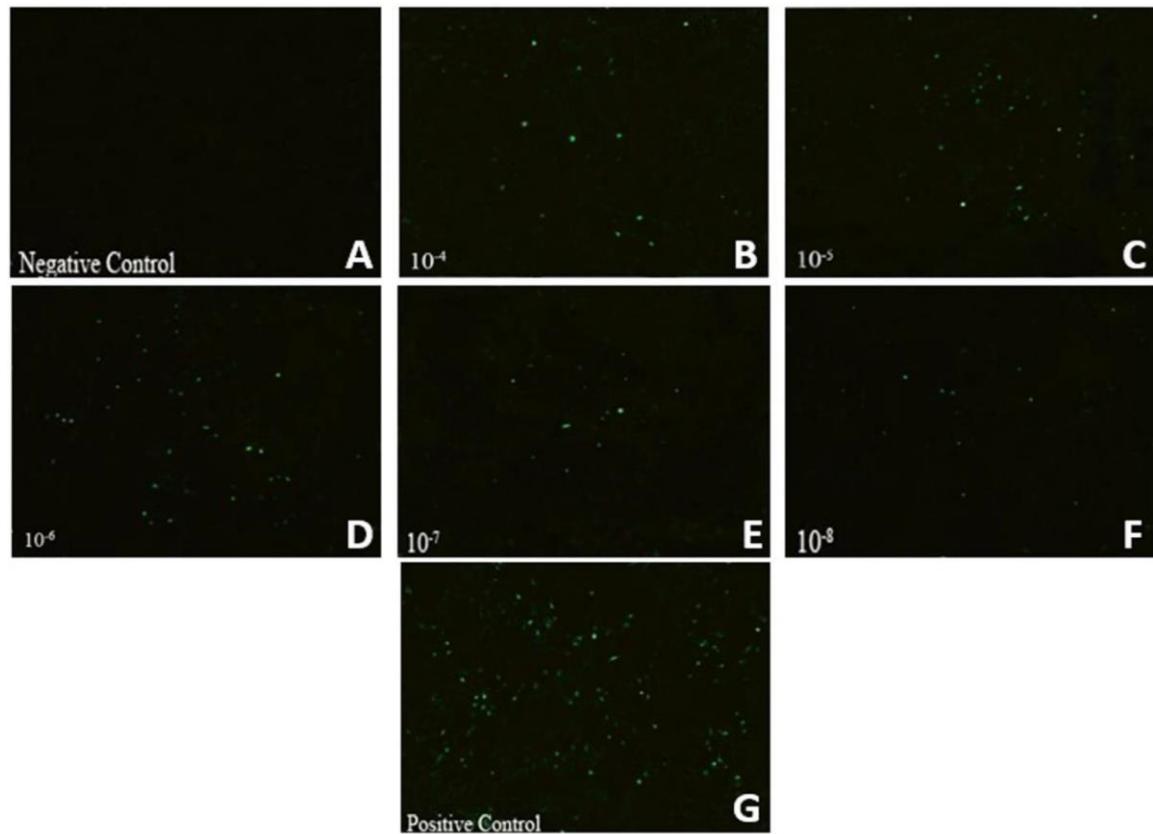


Figure12. Photos de la fluorescence produite par les biosenseurs après exposition à différentes concentrations de mercure [72].

8.2. *In situ*

Après avoir exploré les performances des biosenseurs bactériens en conditions contrôlées, il apparaît essentiel d'évaluer leur comportement en milieu réel ou simulé, où les contraintes physiques, chimiques et biologiques peuvent altérer la stabilité des signaux et la viabilité des cellules. Les applications environnementales exigent non seulement une sensibilité élevée à de faibles concentrations de polluants, mais aussi une robustesse face aux variations du milieu (pH, humidité, oxygénation, interactions avec la matrice solide).

- ✓ Exemple 1. Étude de biosenseur de nouvelle génération pour la détection *in situ* dans les sols contaminés

L'étude menée par Liu, X *et al.* (2010) représente un exemple emblématique de biosenseur de nouvelle génération, c que les sols contaminés [73]. Ce système repose sur

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

l'utilisation combinée de deux souches bactériennes génétiquement modifiées : *Pseudomonas fluorescens* F113, adaptée aux environnements telluriques, et *Escherichia coli* DH5α, couramment utilisée comme souche de référence en laboratoire. Les bactéries ont été transformées avec deux gènes rapporteurs complémentaires :

- *gfp*, permettant une détection par fluorescence (excitation à 488 nm, émission à 510 nm), avec une sensibilité de 0,1 µg/L de polychlorobiphényle (PCB) mesurée par microscopie
- *luxCDABE*, produisant un signal bioluminescent détecté par luminométrie, avec une plage de réponse linéaire comprise entre 0,5 et 50 µg/L et un temps de réponse inférieur à deux heures.

L'expression de ces gènes est régulée par deux promoteurs spécifiques : *bphA*, activé en présence de PCB, et *pobA*, sensible à certains composés aromatiques légers. Cette configuration permet de distinguer les signaux émis selon la nature des contaminants présents dans le milieu.

Afin de garantir une utilisation sûre et contrôlée en environnement ouvert ou semi-ouvert, un dispositif de confinement biologique à trois niveaux a été mis en œuvre :

- Auxotrophie génétique : par délétion du gène *trpB*, empêchant toute prolifération autonome des bactéries dans la nature.
- Encapsulation physique : sous forme de microsphères d'alginate-chitosan de $250 \pm 50 \mu\text{m}$ de diamètre (obtenues par microfluidique), renforcées par un revêtement de silice nanoporeuse, avec une rétention cellulaire > 99,7 % (validée par PCR quantitative).
- Confinement expérimental : via l'utilisation de microcosmes¹ clos sous pression négative (-5 Pa) pour les essais sur sols artificiellement contaminés.

Les tests environnementaux ont été réalisés dans différents milieux, allant de cultures liquides standard à des sols argileux à 30 % d'humidité, simulant des conditions proches de terrain. Les signaux émis par les bactéries ont montré une forte corrélation avec les concentrations de PCB mesurées par GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry) ($R^2 = 0,96\text{--}0,99$), validant la précision du système. La stabilité du signal a été confirmée sur 30

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

jours à 25°C, avec une décroissance inférieure à 20 %, attribuée notamment à l'intégration de promoteurs secondaires sensibles au stress oxydatif (ex. : système *oxyR*) [73].

La récupération des cellules encapsulées a été optimisée par un protocole en trois étapes : lyse ultrasonique douce (40 kHz, 30 s), centrifugation différentielle (3000–5000 g) et séparation magnétique à l'aide de billes de Fe₃O₄ fonctionnalisées, atteignant une efficacité de 97 ± 2 % [73].

Conforme aux exigences de sécurité de la Directive européenne 2009/41/CE (confinement NS-1) et présentant un taux de mutation spontanée inférieur à 10⁻⁸, ce biosenseur a été validé sur 12 congénères de PCB prioritaires, dont les très toxiques PCB-77 et PCB-126.

⁴Microcosme : Un microcosme clos sous pression négative est un dispositif de laboratoire utilisé pour tester les biosenseurs dans des conditions simulées proches du terrain, notamment des sols contaminés, tout en assurant :

- Le confinement biologique, en évitant toute libération accidentelle de bactéries génétiquement modifiées.
- Le contrôle des variables environnementales (température, humidité, redox, oxygénéation, etc.).
- La sécurité expérimentale, grâce à la pression négative (-5 Pa), qui empêche l'air ou les particules de s'échapper du système.

- ✓ Exemple 2. Application *in situ* de biosenseur bactérien à base des spores de *Bacillus subtilis*

Dans une étude récente, Valenzuela-García *et al.* (2023), ont conçu un biosenseur bactérien innovant reposant sur l'utilisation de spores de *Bacillus subtilis* pour la détection de l'arsenic dans des milieux environnementaux. Ce dispositif repose sur l'intégration, dans la souche 168 de *B.subtilis*, d'un plasmide recombinant (pAD123-Pars : gfpmut3a) contenant le promoteur inductible de l'opéron ars fusionné au gène *gfpmut3a*, une forme optimisée de la GFP. En présence d'arsénite [As (III)] ou d'arsénate [As(V)], le promoteur est activé, induisant une production mesurable de GFP. La fluorescence générée est détectable sous lumière UV, permettant une lecture rapide, sans réactif additionnel [74].

Le biosenseur se distingue par sa haute spécificité : il ne réagit pas à d'autres métaux lourds comme le plomb, le chrome, le cadmium ou le zinc, ni à des formes organiques de l'arsenic telles que l'Acide diméthylarsinate pentavent (DMAV). Sa sensibilité est également remarquable, avec une limite de détection de 0,1 µM (environ 7,7 µg/L), en deçà du seuil fixé par l'Organisation mondiale de la santé pour l'eau potable (10 µg/L) [74].

L'un des éléments clés de ce système est le recours à la sporulation naturelle de *B.subtilis*, qui remplace les méthodes classiques d'encapsulation, les spores ainsi formées agissent comme des capsules biologiques naturelles, extrêmement résistantes aux agressions environnementales (chaleur, dessiccation, UV, stress chimique). Elles permettent un stockage prolongé à température ambiante et assurent une activation rapide du biosenseur après réhydratation, avec détection en seulement 4 heures. [74]

Par ailleurs, la souche utilisée présente une tolérance élevée à l'arsenic, avec une DL₅₀ de 0,89 µg/L pour As (III) après 12 heures. Étant non pathogène et classée GRAS (Generally Recognized As Safe), elle est particulièrement adaptée aux déploiements sur le terrain, notamment dans les eaux souterraines, les sols contaminés ou les zones isolées.

Enfin, cette approche incarne une stratégie efficace de bioconfinement génétique, en limitant la dissémination de micro-organismes génétiquement modifiés. La germination des spores n'induit l'expression du gène rapporteur qu'en présence du polluant cible, garantissant

Chapitre II. Méthode de conception des biosenseurs bactériens appliqués à la surveillance environnementale

un contrôle strict de l'activation et renforçant la sécurité biologique globale du système. Ce biosenseur tout-en-un constitue ainsi une solution robuste, portable et fiable pour la biosurveillance environnementale *in situ* [74].

Ces exemples démontrent l'efficacité des biosenseurs bactériens pour la détection *in situ* de polluants dans des matrices complexes. Cependant, leur performance dépend fortement de leur stabilité et de leur confinement dans l'environnement. C'est dans ce contexte que l'immobilisation cellulaire joue un rôle fondamental, en assurant à la fois la viabilité des cellules et la robustesse du signal dans des conditions réelles d'utilisation [74].

9. Immobilisation des biosenseurs bactériens

L'immobilisation est une technique essentielle pour améliorer la stabilité, la réutilisabilité et la facilité de manipulation des biosenseurs bactériens, en particulier dans des dispositifs d'analyse *in vitro* ou *in situ*. Elle consiste à fixer les bactéries vivantes porteuses de constructions génétiques (plasmides) sur ou dans un support solide ou semi-solide, tout en maintenant leur viabilité et leur capacité de réponse biologique. Cette approche permet de créer des biosenseurs plus robustes, mieux adaptés à des applications de terrain ou à des analyses répétées. Plusieurs méthodes d'immobilisation sont utilisées, notamment l'encapsulation dans des matrices de polymères (alginate de sodium, agarose, polyacrylamide), l'adsorption sur des membranes (cellulose, nitrocellulose) ou la réticulation chimique. Le choix du support dépend du type de signal à détecter (bioluminescence, fluorescence...), de la durée d'utilisation souhaitée, et de la compatibilité avec les cellules. L'alginate est particulièrement populaire en raison de sa biocompatibilité et de sa facilité de mise en œuvre. Par exemple, dans une étude menée par Jansen, M *et al.* (2021), des cellules d'*E. Coli* biosenseurs bioluminescents ont été immobilisées dans une matrice d'alginate déposée sur une plaque à puits. Les cellules ont conservé leur capacité de détection du mercure pendant plus de 10 jours, avec une réponse stable et reproductible. Cette méthode a permis des mesures en continu sans avoir à renouveler la culture bactérienne à chaque analyse [63].

L'immobilisation permet également de minimiser la contamination, de faciliter le transport des biosenseurs sur le terrain, et d'augmenter la précision des mesures en réduisant les variations

liées à la croissance cellulaire. Toutefois, elle peut parfois entraîner une perte partielle de sensibilité, liée à la diffusion limitée des analytes dans la matrice [63].

10. Analyse et détection du signal

Dans le fonctionnement des biosenseurs bactériens, l'émission d'un signal mesurable, souvent sous forme de bioluminescence, constitue l'étape finale traduisant la reconnaissance d'une substance cible. Pour exploiter pleinement cette réponse, il est essentiel de disposer de méthodes précises permettant de détecter, enregistrer et analyser ce signal. L'analyse du signal bioluminescent permet non seulement de confirmer la présence de l'élément recherché, mais aussi d'évaluer sa concentration et d'étudier la dynamique de la réponse bactérienne.

10.1. La bioluminescence

La détection et le suivi de la bioluminescence des biosenseurs bactériens reposent principalement sur l'utilisation de dispositifs sensibles capables de capter la faible lumière émise par les bactéries génétiquement modifiées exprimant des gènes luminescents, tels que *lux*. Parmi les méthodes les plus courantes, les caméras CCD (Charge-Coupled Device) sont largement utilisées pour leur haute sensibilité et leur capacité à capturer des images en temps réel, notamment dans des environnements obscurs ou des incubateurs spécialisés. Ces caméras permettent de suivre la distribution spatiale de la lumière et l'évolution du signal dans le temps [75]. Pour des mesures plus quantitatives, le luminomètre constitue un outil efficace : il mesure l'intensité de la lumière produite par les bactéries en solution, offrant une réponse rapide et reproductible, souvent exprimée en Unités Relatives de Luminescence (RLU) [76]. Une autre approche consiste à utiliser des lecteurs de microplaques compatibles avec la détection de la luminescence, permettant le traitement simultané de nombreux échantillons dans des puits séparés, ce qui est idéal pour les tests à haut débit ou les études de cinétique [77]. Dans des applications plus complexes, notamment en recherche biomédicale ou environnementale, l'imagerie *in vivo* permet de visualiser la bioluminescence directement dans des systèmes biologiques vivants, grâce à des équipements spécialisés. Quel que soit le dispositif utilisé, certaines conditions expérimentales doivent être rigoureusement respectées ; une obscurité totale pour éviter les interférences lumineuses, une température contrôlée adaptée à l'activité de la luciférase, et une normalisation de la densité bactérienne pour garantir la reproductibilité

des mesures. Ces techniques de détection offrent ainsi des outils puissants pour exploiter pleinement le potentiel des biosenseurs bactériens luminescents dans des contextes variés, allant du suivi environnemental à la recherche biomédicale [78].

10.2. Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est une technique essentielle pour détecter et analyser les signaux émis par les biosenseurs bactériens. Elle repose sur l'expression des fluorophores tels que la GFP, produits par des bactéries génétiquement modifiées en réponse à un stimulus spécifique (par exemple, des métaux lourds, des toxines ou des polluants). Lorsque ces bactéries rencontrent la substance cible, un gène rapporteur est activé, entraînant la production d'une protéine fluorescente. Le microscope projette alors une lumière d'excitation (souvent bleue ou violette) sur l'échantillon, ce qui provoque l'émission d'une lumière à une longueur d'onde plus grande, filtrée et captée par le système optique. L'image ainsi formée permet de visualiser en temps réel les cellules fluorescentes avec une haute résolution spatiale. L'intensité du signal détecté est directement proportionnelle à l'activité du gène rapporteur, donc à la concentration de l'agent cible. Cette méthode permet de localiser, de quantifier et de suivre la réponse bactérienne de manière sensible, non destructive et dynamique, notamment pour évaluer la biodisponibilité de contaminants comme le plomb, le cadmium ou l'arsenic. Elle est également précieuse pour étudier la variabilité intercellulaire et les interactions bactéries-environnement au niveau cellulaire (Figure13) [79,80].

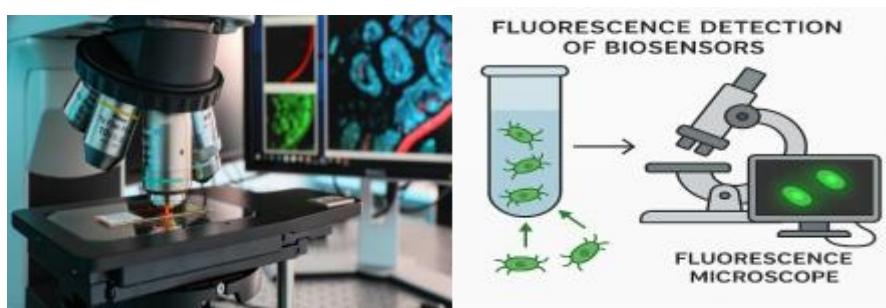


Figure13. Détection et visualisation des biosenseurs bactériens par microscopie à fluorescence.

Chapitre III

Perspectives, innovations et défis des biosenseurs bactériens

perspectives

innovations et défis

1. Perspectives

Dans le domaine des biosenseurs bactériens, une équipe du Massachusetts Institute of Technology (MIT) a développé un système biohybride innovant associant des souches d'*Escherichia coli* génétiquement modifiées (intégrant l'opéron *lux*) à des drones équipés de capteurs optiques de haute précision (photomultiplicateurs et caméras hyperspectrales couvrant le spectre 400-1000 nm) [81]. Ce dispositif permet la détection en temps réel (<30 min) de composés chimiques cibles, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les métaux lourds (As³, Cd²), les agents pathogènes et les pesticides via l'émission lumineuse des souches bactériennes, traduite en données exploitables par algorithme d'apprentissage automatique. Les performances remarquables incluent une sensibilité atteignant 0,1 ppb pour certains composés, une spécificité de 92% et une stabilité opérationnelle de 95% sur 72 heures. Cette innovation positionne les biosenseurs bactériens comme une solution prometteuse pour le monitoring environnemental, offrant une surveillance autonome *in situ* sans intervention humaine et une précision accrue (seuil de détection jusqu'à 0,1 ppb). Néanmoins, des limites persistent, notamment concernant la stabilité des souches *in vivo* et les risques de faux positifs (taux estimé à 3,2%) liés à la spécificité des biosenseurs (figure 14) [82].



Figure 14. Système biohybride drone-bactéries [81].

2. Innovations technologiques et approches multidisciplinaires

2.1. Intégration des nanotechnologies dans les biosenseurs bactériens

L'intégration des nanotechnologies dans les biosenseurs bactériens permet de concevoir des dispositifs plus sensibles, plus rapides et miniaturisés. Les nanomatériaux

comme les nanoparticules d'or, les nanotubes de carbone, les nanofils, ou encore les quantum dots (points quantiques) peuvent interagir directement avec les bactéries génétiquement modifiées ou avec les signaux qu'elles produisent. Par exemple, des nanoparticules métalliques peuvent être utilisées comme supports pour fixer des bactéries capteurs, augmentant la surface d'interaction avec l'échantillon et améliorant ainsi la détection. Les quantum dots peuvent servir à amplifier les signaux optiques produits par des bactéries bioluminescentes ou fluorescentes, permettant une détection très sensible même à très faibles concentrations de cible. En outre, les nanocapteurs électrochimiques permettent de convertir les signaux biologiques produits par les bactéries (comme le métabolisme ou la libération d'ions) en signaux électriques facilement mesurables. Cependant, ces approches présentent aussi des défis ; la toxicité potentielle des nanomatériaux pour les cellules vivantes, la stabilité des nanostructures, et les problèmes de reproductibilité dans des conditions réelles d'utilisation.

L'association des bactéries comme capteurs vivants avec des structures nanométriques ouvre la voie à des biosenseurs extrêmement performants, pouvant être utilisés *in situ* pour la surveillance de l'environnement, le diagnostic médical, ou la sécurité alimentaire [34].

2.2. Intégration microfluidique (Lab-on-Chip)

L'intégration des biosenseurs bactériens dans des dispositifs microfluidiques, également appelés Lab-on-Chip (LOC), constitue une avancée majeure vers la miniaturisation, l'automatisation et la portabilité des systèmes de détection biologique. Ces dispositifs permettent de manipuler de très faibles volumes de liquides (généralement en microlitres ou nanolitres) dans des réseaux de microcanaux, tout en assurant des conditions de culture et de mesure optimisées pour les bactéries. Dans ce contexte, les cellules bactériennes génétiquement modifiées sont immobilisées ou circulent librement dans les canaux microfluidiques, où elles peuvent interagir avec des échantillons environnementaux ou cliniques. Cette configuration améliore la sensibilité, la réactivité temporelle et la reproductibilité des biosenseurs, tout en réduisant la consommation des réactifs et le risque de contamination croisée. Par exemple, Park *et al.* (2022) ont développé un dispositif microfluidique intégrant des *E. coli* bioluminescents pour la détection rapide du cadmium dans des échantillons d'eau, avec une limite de détection inférieure à 1 µg/L et un temps de réponse de moins de 30 minutes. Ce type de plateforme s'avère particulièrement prometteur pour une surveillance *in situ* dans des milieux difficiles d'accès [83].

En outre, les systèmes LOC permettent l'intégration de multiples étapes expérimentales (culture bactérienne, induction, détection optique) sur une seule puce, facilitant ainsi le développement des biosenseurs portables, voire connectés, adaptés à une utilisation sur le terrain ou en point-of-care dans un contexte médical [84].

L'utilisation de la microfluidique dans le domaine des biosenseurs bactériens présente plusieurs avantages déterminants. D'une part, elle permet de travailler avec des volumes extrêmement réduits, ce qui diminue significativement les coûts liés aux réactifs et favorise une meilleure sécurité biologique. D'autre part, les dispositifs microfluidiques offrent un contrôle précis des conditions expérimentales (température, flux, pH), ce qui est essentiel pour garantir la viabilité bactérienne et la stabilité des signaux émis [85].

3. Défis techniques et biologiques

3.1 Stabilité et conservation des bactéries biosenseurs

L'un des principaux défis liés à l'utilisation pratique des biosenseurs bactériens est leur conservation à long terme tout en maintenant leur viabilité et fonctionnalité. Une fois génétiquement modifiées, les cellules bactériennes deviennent sensibles aux conditions environnementales, et peuvent perdre leur capacité de détection en cas de stress ou de stockage inapproprié. Parmi les méthodes couramment utilisées, la lyophilisation (séchage par congélation sous vide) et la cryoconservation permettent de maintenir les bactéries dans un état de dormance et de faciliter leur transport à température ambiante. Toutefois, ces techniques peuvent endommager les membranes cellulaires et réduire la viabilité de 30 à 70 %, même avec l'utilisation de cryoprotecteurs comme le tréhalose [86, 87, 88].

Une alternative intéressante est la bioencapsulation, qui consiste à immobiliser les cellules dans des matrices polymériques telles que l'alginate, le chitosane-PVA ou la gélatine. Cette approche protège les bactéries des stress environnementaux (UV, variations de pH, métaux lourds) et facilite leur intégration dans des dispositifs portables ou *in situ*. Toutefois, elle présente l'inconvénient de ralentir la diffusion des nutriments et des analytes, ce qui peut réduire la sensibilité et augmenter le temps de réponse de plus de 30 % [89]. Des solutions innovantes comme les matrices hybrides associant alginate et nanoparticules de silice ont récemment montré une meilleure stabilité sans compromettre la perméabilité, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour le développement des biosenseurs robustes.

Malgré leur potentiel, ces techniques doivent encore être optimisées pour chaque type de biosenseur, en fonction du micro-organisme utilisé, du type de signal généré (bioluminescence, fluorescence, etc.) et des conditions d'utilisation (température ambiante, exposition à des contaminants, durée d'utilisation). La standardisation de ces méthodes reste un enjeu majeur pour permettre le passage des biosenseurs bactériens du laboratoire à une utilisation sur le terrain ou en milieu industriel [90].

3.2 Risques de contamination croisée dans les applications *in situ*

L'utilisation des biosenseurs bactériens dans des environnements naturels ou industriels pose la question cruciale de la contamination croisée, c'est-à-dire le transfert involontaire des bactéries biosenseurs vers des milieux non ciblés ou leur interaction avec des micro-organismes indigènes. Ce phénomène peut compromettre la fiabilité des résultats obtenus, mais aussi soulever des inquiétudes en matière de biosécurité et de bioconfinement.

Dans les applications *in situ*, comme la détection des polluants dans les sols, les eaux ou les effluents industriels, les bactéries génétiquement modifiées (BGM) sont souvent exposées à des communautés microbiennes complexes. Cela peut engendrer des échanges horizontaux des gènes (notamment via des plasmides), modifiant potentiellement les propriétés des microbes environnants et rendant difficile l'interprétation des signaux émis. Par ailleurs, une prolifération incontrôlée ou une migration des BGM vers des niches écologiques sensibles représente un risque écologique non négligeable [91, 92, 93].

Pour limiter ces risques, plusieurs stratégies sont envisagées :

- L'usage des systèmes de bioconfinement génétique (par exemple, l'intégration des gènes de dépendance à des nutriments synthétiques).
- L'immobilisation physique des cellules sur des supports (microcapsules, membranes) empêchant leur dispersion.
- Le développement des biosenseurs sans cellules (cell-free biosensors) utilisant des extraits bactériens ou des systèmes transcription-traduction *in vitro*, qui éliminent les risques liés à la présence d'organismes vivants.

3.3 Complexité des signaux et biodisponibilité des métaux.

L’interprétation des signaux émis par les biosenseurs bactériens dans la détection des métaux lourds est fortement influencée par la spéciation chimique de ces éléments, qui détermine leur biodisponibilité pour les micro-organismes. Un exemple emblématique est fourni par Selifonova *et al.* (1993) [94], qui ont conçu une souche d'*Escherichia coli* bioluminescente dont le signal est activé spécifiquement par les ions de mercure (Hg^{2+}). Ce système permet de détecter uniquement la fraction bioaccessible du mercure, en générant une bioluminescence proportionnelle à sa concentration. Cependant, ils ont également montré que cette réponse dépend fortement de la spéciation du mercure, soulignant l’influence des conditions environnementales sur la sensibilité du biosenseur. Dans la continuité de ces travaux, Nagata *et al.* (2010, 2011), ont mis au point un biosenseur capable de détecter le méthylmercure (CH_3Hg^+), une forme organométallique plus toxique et plus difficile à détecter. Leur système repose sur la coexpression du gène *merB*, permettant la dégradation intracellulaire du CH_3Hg^+ en Hg^{2+} , qui active ensuite la réponse bioluminescente. Grâce à cette stratégie, ils ont atteint une limite de détection de l’ordre de 10 pM, démontrant que la sensibilité du système dépend de la capacité à convertir ou reconnaître la forme chimique du métal. Ces approches mettent en évidence que la perméabilité membranaire, la disponibilité intracellulaire et les interactions avec les régulateurs transcriptionnels sont des facteurs déterminants de la cinétique et de l’intensité du signal. Dans les matrices environnementales complexes, comme les sols contaminés, la formation de complexes stables avec des ligands naturels (matière organique, sulfures) peut encore diminuer la biodisponibilité du mercure. Une modélisation tenant compte de paramètres physico-chimiques tels que le pH, le potentiel d’oxydo-réduction ou les concentrations ioniques s’avère alors indispensable pour relier le signal biologique à la concentration réellement accessible du métal. Ces résultats soulignent l’importance de coupler biologie synthétique, chimie environnementale et modélisation pour améliorer la pertinence des biosenseurs bactériens dans des conditions *in situ* [95, 96, 97].

4. Enjeux éthiques, règlementaires et sécuritaires.

Les organismes génétiquement modifiés, bien qu’ils n’aient pas encore causé de dommages avérés, sont soumis à des contrôles rigoureux dès les premiers stades de la recherche jusqu’à leur mise sur le marché, en raison des incertitudes liées à leur nature technologique. Les enjeux liés aux OGM se déclinent en trois grandes catégories : éthiques, réglementaires et sécuritaires (sanitaires et environnementaux) [98].

4.1 Enjeux éthiques liés aux OGM.

- Modification du vivant et responsabilité: la manipulation génétique soulève des questions sur la légitimité de transformer la nature et le vivant, notamment sur les limites morales à ne pas dépasser , bien que la réglementation algérienne en matière d'environnement soit abondante, elle ne consacre qu'un seul texte aux OGM et au principe de précaution, indiquant un besoin de renforcement du cadre juridique national dans ce domaine, notamment des bactéries utilisées comme biosenseurs, soulève des questions éthiques sur la manipulation du vivant et ses conséquences imprévues. Le principe de précaution est central, car les effets à long terme sur les écosystèmes et la santé humaine restent incertains [99,100]. Ce questionnement porte aussi sur le respect de l'intégrité des espèces et les impacts potentiels sur les générations futures [101].
- Liberté et transparence : l'introduction d'OGM dans l'environnement ou dans la chaîne alimentaire doit respecter la liberté des agriculteurs et des consommateurs, avec une information claire et un étiquetage transparent. Cela est d'autant plus important pour les bactéries biosenseurs utilisées en milieu naturel, car leur dissémination peut être difficile à contrôler [102].
- Principe de précaution et responsabilité : l'éthique impose que les promoteurs d'OGM soient responsables des risques, connus ou potentiels, et que le principe de précaution soit appliqué face à l'incertitude scientifique [98].
- Usage dual et risques de militarisation : certaines biotechnologies, notamment les micro-organismes génétiquement modifiés, peuvent être détournées à des fins hostiles (armes biologiques), ce qui pose un enjeu éthique majeur dans leur développement et leur contrôle [99].

4.2 Enjeux réglementaires

L'encadrement des OGM est très strict, particulièrement en Europe, avec des procédures d'évaluation, de surveillance et de traçabilité, la convention sur la diversité biologique (1992) mentionne les OGM, bien que de manière réservée. Le protocole de Cartagena (2000) sur la prévention des risques biotechnologiques reconnaît que les OGM présentent des risques spécifiques pour l'environnement et la santé humaine, et établit des conditions pour le commerce international de ces produits, consacrant ainsi le principe de précaution [98].

- ✓ Évaluation rigoureuse des risques : l’Union européenne impose une évaluation rigoureuse des risques sanitaires et environnementaux par European Food Safety Authority (EFSA), conformément à la directive 2001/18/CE et au règlement (UE) n°503/2013 [103]. Toute utilisation d’OGM, y compris les bactéries biosenseurs, doit faire l’objet d’une évaluation approfondie des risques sanitaires et environnementaux, selon les normes européennes (directive 2001/18/CE, règlement UE 503/2013). Cette évaluation inclut le potentiel de dissémination, la toxicité, et les effets sur les organismes non ciblés [103,104].
- ✓ Possibilité de refus par les États membres : la directive (UE) 2015/412 permet aux États membres de refuser la culture d’OGM pour des raisons socio-économiques ou d’ordre public, au-delà des seuls critères sanitaires ou environnementaux [105].
- ✓ Surveillance et traçabilité : les OGM autorisés sont soumis à des mesures strictes de surveillance post-commercialisation, ainsi qu’à des obligations d’étiquetage pour garantir la transparence auprès des consommateurs, les OGM commercialisés sont soumis à des mesures strictes de surveillance post-commercialisation et doivent être clairement identifiés pour garantir la transparence [101,104].
- ✓ Débat sur les nouveaux OGM : la réglementation européenne est actuellement en débat concernant les nouvelles techniques d’édition génomique, avec un risque de dérégulation qui inquiète quant à la sécurité et à la transparence [103].
- ✓ Précautions spécifiques pour les bactéries biosenseurs : l’utilisation de bactéries modifiées comme biosenseurs dans l’environnement nécessite des protocoles spécifiques pour éviter la dissémination incontrôlée et les impacts sur les microbiotes naturels [99].

4.3 Enjeux sécuritaires

4.3.1. Risques sanitaires

Bien que les OGM commercialisés n’aient pas démontré d’effets sanitaires négatifs avérés, la prudence impose une surveillance continue pour détecter d’éventuels effets à long terme [100]. Les bactéries peuvent induire des effets allergiques ou toxicologiques, notamment si des protéines nouvelles sont exprimées [104]. Pour les bactéries biosenseurs, le risque est lié à leur interaction avec les organismes naturels et la possibilité de transfert horizontale de gènes [105].

4.3.2. Risques environnementaux

Les risques environnementaux liés à l'utilisation des biosenseurs sont les suivants :

- ✓ Contamination génétique des espèces sauvages par transfert de gènes [98].
- ✓ Impact sur la biodiversité, notamment sur les insectes non ciblés et les polliniseurs essentiels à l'écosystème [106].
- ✓ L'apparition de résistances chez les ravageurs ou les adventices peut entraîner une augmentation de l'utilisation d'herbicides et d'insecticides, aggravant ainsi la pollution des sols et des eaux [98].
- ✓ Contamination génétique par transfert horizontal ou croisement avec des organismes sauvages [102,105].
- ✓ Perturbation des écosystèmes microbiens, notamment par l'introduction de bactéries modifiées produisant des molécules actives [99].
- ✓ Apparition des résistances ou effets toxiques sur des espèces non ciblées, comme les polliniseurs ou les micro-organismes du sol [104].

L'objectif visé par ce travail théorique est de mettre l'accent sur l'importance des biosenseurs bactériens utilisés comme une technologie innovante et prometteuse pour la surveillance environnementale. Ces dispositifs utilisent des bactéries génétiquement modifiées ou naturelles pour détecter et signaler la présence de polluants, de métaux lourds et d'autres substances nocives dans l'environnement. Les applications des biosenseurs bactériens dans ce domaine sont vastes et variées, offrant des solutions efficaces et respectueuses de l'environnement pour la détection et le suivi des contaminants.

Les biosenseurs bactériens fonctionnent en utilisant des bactéries équipées de gènes rapporteurs qui produisent un signal mesurable en réponse à un stimulus spécifique. Par exemple, en présence de métaux lourds comme le mercure, les bactéries peuvent activer des gènes qui produisent une protéine fluorescente, permettant ainsi une détection visuelle ou quantitative du polluant. Ces dispositifs combinent la sensibilité et la spécificité des réactions biologiques avec la précision des techniques de détection modernes.

Les biosenseurs bactériens sont utilisés pour surveiller la qualité de l'eau, des sols. Ils peuvent détecter une large gamme de polluants, y compris les métaux lourds, les hydrocarbures, les pesticides et les pathogènes. Par exemple, des biosenseurs bactériens ont été développés pour détecter la présence de mercure, de cadmium et de plomb dans les eaux usées industrielles, ainsi que pour surveiller la contamination des sols par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Les biosenseurs bactériens offrent plusieurs avantages par rapport aux méthodes traditionnelles de surveillance environnementale. Ils sont souvent plus sensibles, plus spécifiques et plus rentables. De plus, ils peuvent être utilisés pour une surveillance en temps réel et *in situ*, ce qui permet une détection rapide et précise des contaminants. Les biosenseurs bactériens sont également respectueux de l'environnement, car ils utilisent des organismes vivants et des processus biologiques naturels.

Malgré leurs nombreux avantages, les biosenseurs bactériens présentent également des défis. La stabilité et la durabilité des bactéries dans des environnements complexes peuvent être des problèmes, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour améliorer leur performance et leur fiabilité. De plus, l'intégration des biosenseurs bactériens dans les systèmes

de surveillance existants nécessite des développements technologiques et des investissements supplémentaires.

En conclusion, les biosenseurs bactériens offrent des perspectives prometteuses pour la surveillance environnementale. Leur capacité à détecter une large gamme de polluants avec une grande sensibilité et spécificité en fait des outils précieux pour la protection de l'environnement et la santé publique. En termes de perspectives à venir, des recherches et des développements continus sur les biosenseurs bactériens pourraient leur permettre de jouer un rôle de plus en plus important dans la surveillance et la gestion de la qualité environnementale.

Références bibliographiques

- [1] Leland Clark, Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, Trans –Am. Soc. Artif.Intern. Organs.2(1956)41.
- [2] Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, Ann.N.Y. Acad.Sci.102(1962)29-45.
- [3] PARRELLO,D.(2014). Conception de biosenseurs fluorescents multicolores pour l'identification in vivo des interactions bio-physicochimiques dans les systèmes minéral-bactérie.Thèse de doctorat : Géosciences.Université de Lorraine : l'Université de Lorraine.241p.
- [4] Benaksas,H.Yahi,I.(2022). Application des biocapteurs dans le contrôle de la qualité des aliments en industrie agro-alimentaire : Synthèse bibliographique. Mémoire de master : Qualité des produits et sécurité alimentaire. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A : Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A .38p.
- [5] Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 59(3), 223–239.
- [6] Colomb, F. (2011). La GFP : une protéine luminescente pour visualiser la vie. Pour la Science, Dossier Hors Série n° 71, juillet-septembre 2011
- [7] BETOLNGAR,D.B.,(2015). Développement d'un nouveau couple de protéines fluorescentes pour le FRET : validation et application à un biosenseur d'activité kinase A.Thèse de doctorat :chimie. UNIVERSITÉ PARIS-SUD : UNIVERSITÉ PARIS-SUD.172p.
- [8] Delatour,E.(2023). Biosenseurs bactériens bioluminescents pour la détection de Métaux en solution : mesurer et formaliser les relations entre réponse temporelle des biosenseurs, métabolisme cellulaire et biodisponibilité/spéciation des métaux. Thèse de doctorat : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes. Université de Lorraine Ecole doctorale SIRNa - Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles : Université de Lorraine, 221p.

- [9] Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., Malik, K. A., & van der Meer, J. R. (2003). Des biosenseurs bactériens pour la détection de l'arsenic dans l'eau potable. EAWAG news 56f, 12–15.
- [10] Li, Y., Li, S., Wang, J., & Liu, G. (2019). CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. Trends in Biotechnology, 37(7), 730-743.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
- [11] Chang, H.-J., Zúñiga, A., Conejero, I., Voyvodic, P. L., Gracy, J., Fajardo-Ruiz, E., Cohen-Gonsaud, M., Cambray, G., Pageaux, G.-P., Meszaros, M., Meunier, L., & Bonnet, J. (2021). Programmable receptors enable bacterial biosensors to detect pathological biomarkers in clinical samples. Nature communication, 12,5216. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25538-y>
- [12] Marrakchi, M. (2006). Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et de micro-organismes sur microélectrodes interdigitées (By Tunis El Manar University & Ecole Centrale de Lyon).
- [13] Rogers, S. J., Hayden, D., Hepburn, S., Charlifue-Smith, R., Hall, T., & Hayes, A. (2006). Teaching young nonverbal children with autism useful speech: A pilot study of the Denver Model and PROMPT interventions. Journal of Autism and Developmental Disorders, 36(8), 1007–1024. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0142-x>
- [14] Gammoudi, I. (2012, June 18). Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental. <https://theses.hal.science/tel-00985827v1>
- [15] Zammit, C. M., Quaranta, D., Gibson, S., Zaitouna, A., Brown, N. L., & Beveridge, T. J. (2013). A whole-cell biosensor for the detection of gold. PLOS ONE, 8(8), e69292. xxxx<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069292>
- [16] Gosset, A. (2018, April 6). Evaluation de l'écotoxicité des rejets urbains par temps de pluie : Développement d'une batterie de bioessais et application à la conception de biocapteurs. <https://theses.hal.science/tel-02004353v1>

- [17] Abbou, A. (2013). Les biocapteurs à base des polymères [Mémoire de licence, Université Mohamed El Bachir Elibrahimi]. Bordj Bou Arreridj, Algérie.
- [18] Jouanneau, S., Svinartchouk, F., & Cohen-Gonsaud, M. (2011). Les troubles du spectre autistique : évaluation et prise en charge précoce. Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence, 59(5), 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.neurenf.2011.02.003>
- [19] Védrine, L., Caron, J., & Haelewyck, M.-C. (2003). Adaptation et validation d'un outil d'évaluation des compétences sociales chez les personnes présentant un retard mental. Revue francophone de la déficience intellectuelle, 14, 19-34.
- [20] Barhoumi, C., Guillon, Q., Afzali, M. H., Pierron, V., Carlier, M., Schmitz, C., & Deruelle, C. (2018). Visual social attention in autism spectrum disorder: Insights from eye tracking studies. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 90, 147-162.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.04.004>
- [21] Barron, M. (2023, September). Bacterial Biosensors: The Future of Analyte Detection. American Society for Microbiology. <https://asm.org/articles/2023/september/bacterial-biosensors-the-future-of-analyte-detecti>
- [22] Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., & Wilkins, E. (1999). Biosensors for detection of pathogenic bacteria. Biosensors and Bioelectronics, 14(7), 599–624.
[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00049-1)
- [23] Vaaben, T. H., Vazquez-Uribe, R., & Sommer, M. O. A. (2022). Characterization of eight bacterial biosensors for microbial diagnostic and therapeutic applications. ACS Synthetic Biology, 11(12), 4184–4192.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00491>
- [24] Park, M., Tsai, S.-L., & Chen, W. (2013). Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. Sensors, 13(5), 5777–5795.
<https://doi.org/10.3390/s130505777>
- [25] Dai, C., & Choi, S. (2013). Technology and Applications of Microbial Biosensor. Open Journal of Applied Biosensor, 2(3), 39-44. <https://doi.org/10.4236/ojab.2013.23005>

- [26] (s. d.). Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire. Base documentaire Procédés chimie - bio - agro, Biochimie alimentaire : analyses et alimentation humaine. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/biochimie-alimentaire-analyses-et-alimentation-humaine-42470210/applications-des-biocapteurs-dans-l-industrie-agroalimentaire-f4010/objectif-f4010niv10001.html>
- [27] BTpack Machinery. (s. d.). What is biosensor technology in the food industry?. BTpack Machinery. <https://fr.btpackmachine.com/info/what-is-biosensor-technology-in-the-food-indus-88578722.htm>
- [28] TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR. Application des biocapteurs pour la détection des pathogènes. In : Nanotechnologies et biotechnologies pour la santé [en ligne]. [s.l.], [s.d.]. Disponible sur : <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/nanotechnologies-et-biotechnologies-pour-la-sante-42608210/application-des-biocapteurs-pour-la-detection-des-pathogenes-bio7115/>
- [29] Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814–825. <https://doi.org/10.1021/cr068123a>
- [30] Liu, M., Yang, W., Zhu, W., & Yu, D. (2025). Innovative applications and research advances of bacterial biosensors in medicine. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1507491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1507491>
- [31] World Health Organization (WHO). (2011). Guidelines for Drinking-water Quality.
- [32] Chen, A., & Chatterjee, S. (2013). Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 42(12), 5425–5438.
- [33] Yetisen, A. K., et al. (2013). Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), 2210–2251.
- [34] Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8.

[35] Huang, C.-W., Lin, C., Nguyen, M. K., Hussain, A., Bui, X.-T., & Ngo, H. H. (2023). A review of biosensor for environmental monitoring: Principle, application, and corresponding achievement of sustainable development goals. *Bioengineered*, 14(1), 58–80.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2095089>

[36] OECD (2021). Emerging technologies for sustainable development: Biosensors and their applications.

[37] Shin, H. J. (2011). Genetically engineered microbial biosensors for *in situ* monitoring of environmental pollution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 867-877.

[38] Bazhenov, S. V., Novoyatlova, U. S., Scheglova, E. S., Praznova, E. V., Mazanko, M. S., Kessenikh, A. G., Kononchuk, O. V., Gnuchikh, E. Y., Liu, Y., Al Ebrahim, R., Zavilgelsky, G. B., Chistyakov, V. A., & Manukhov, I. V. (2023)

[39] Kessenikh, A. G., Novoyatlova, U. S., Bazhenov, S. V., Stepanova, E. A., Khrulnova, S. A., Gnuchikh, E. Y., Kotova, V. Y., Kudryavtseva, A. A., Bermeshev, M. V., & Manukhov, I. V. (2021). Constructing of *bacillus subtilis*-based lux-biosensors with the use of stress-inducible promoters. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 17.

[40] Castillo Henríquez, L., Brenes Acuña, M., Castro Rojas, A., Cordero Salmerón, R., Lopretti Correa, M., & Vega Baudrit, J. R. (2020). Biosensors for the Detection of Bacterial and Viral Clinical Pathogens. *Sensors*, 20(23), 6926. <https://doi.org/10.3390/s20236926>

[41] Bonhomme, L., Dubard, L., Riha, M., Rodrigues, A., & Aussel, L. (2023). Les métallophores : La ruée vers les métaux. *Médecine/Sciences*, 39(8–9), 676–680. <https://doi.org/10.1051/medsci/2023104>

[42] Zhu, P., Molina Resendiz, M., von Ossowski, I., Scheller, S., & Buan, N. R. (n.d.). A promoter–RBS library for fine-tuning gene expression in *Methanosarcina acetivorans*. *Nature Communications*, 10, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13001-2>

[43] Gupta, J. K., & Srivastava, S. (2021). The effect of promoter and RBS combination on the growth and glycogen productivity of sodium-dependent bicarbonate transporter (SbtA)

overexpressing *Synechococcus* sp. PCC 7002 cells. *Microorganisms*, 9(4), 806. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040806>

[44] Elsemore, D. A. (1998). Insertion of promoter region::luxCDABE fusions into the *Escherichia coli* chromosome. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 102, 97-104. <https://doi.org/10.1385/0-89603-520-4:97>.

[45] Ivask, A., Rõlova, T., & Kahru, A. (2009). A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnology*, 9(1), 41.

[46] Van Dyk, T. K., & Rosson, R. A. (1998). *Photorhabdus luminescens luxCDABE* promoter probe vectors. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 102, 85-95.; Ivask, A., Rõlova, T., & Kahru, A. (2009). A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. *BMC Biotechnology*, 9(1), 41.

[47] Van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Sensors*, 11(1), 7865-7887. <https://doi.org/10.3390/s110807865>

[48] Lévy, N. (2008, octobre 20). Prix Nobel de Chimie 2008 : une méduse fluorescente récompensée. Le Monde. <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/prix-nobel-de-chimie-2008-une-meduse-fluorescente>

[49] Sigma-Aldrich. (n.d.). Green Fluorescent Protein (GFP) expressed in *Escherichia coli* (UNSPSC Code: 12352200). Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com>

[50] Gibson, D. G., et al. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.

[51] Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

[52] Zhang, F., et al. (2017). "Engineering bacteria for biosensing applications". *Nature Reviews Genetics*, 18(10), 614-627. [DOI: 10.1038/s41576-017-0049-0].

- [53] Cheng, F., Luo, Y., & Zhang, C. (2019). Synthetic biology approaches for the construction of bacterial biosensors for environmental applications. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107440. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.005>
- [54] JOVE. (2020). Transformation of *E. coli*: Adapted calcium chloride procedure. *Journal of Visualized Experiments*. <https://www.jove.com/v/10515/transformation-of-e-coli-adapted-calcium-chloride-procedure>
- [55] JOVE. (2013). Bacterial Transformation: Electroporation. *Journal of Visualized Experiments*. <https://www.jove.com/v/5060/bacterial-transformation-electroporation>
- [56] Shi, J., Zhao, R., & Chen, Q. (2018). Electroporation-based CRISPR-Cas9 gene editing in Gram-negative bacteria for microbial biosensor development. *ACS Synthetic Biology*, 7(12), 2875-2882. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00303>
- [57] Wang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2020). High-efficiency electroporation for construction of whole-cell biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 152, 112025. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112025>
- [58] Bio-Rad Laboratories. (2022). Electroporation protocols for bacterial transformation. <https://www.bio-rad.com/fr-fr/electroporation>
- [59] Zhang, Y., Liu, R., & Wang, J. (2023). Bioluminescent *Escherichia coli* biosensor for rapid detection of heavy metals in aquatic environments. *Environmental Pollution*, 317, 120854. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120854>.
- [60] Belkin, S., Smulski, D. R., Dadon, S., Vollmer, A. C., Van Dyk, T. K., & Larossa, R. A. (2003). A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. *Water Research*, 37(16), 4363–4370. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00403-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00403-8)
- [61] Van der Meer, J. R., Tropel, D., & Jaspers, M. (2004). Bacterial biosensors for measuring bioavailability of toxic metals. *Environmental Microbiology*, *6*(12), 1189_1199.<https://doi.org/10.1111/j.14622920.2004.00656.x>

-2920.2004.00656.x)

- [62] Belkin, S. (2003). Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. Current Opinion in Microbiology, 6(3), 206–212. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)
- [63] Jansen, M., van der Meer, J. R., & Harms, H. (2021). Environmental factors affecting bacterial bioluminescence-based biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 192, 113481. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113481>
- [64] Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P. et Hobman, J.L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiology Reviews, 27(2-3), 145-163. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00051-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00051-2)
- [65] Pal, A., Bhattacharjee, S., Saha, J., Sarkar, M., & Mandal, P. (2022). Bacterial survival strategies and responses under heavy metal stress: A comprehensive overview. Critical Reviews in Microbiology, 48(3), 327–355. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1970512>
- [66] J.T. Trevors, G.W. Stratton, and G.M. Gadd. Cadmium transport, resistance, and toxicity
- [67] M.R. Bruins, S. Kapil, and F.W. Oehme. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety, 45 :198-207, 2000
- [68] G. Haferburg and E. Kothe. Microbes and metals : interactions in the environment. Journal of Basic Microbiology, 47 :453-467, 2007.
- [69] J.A. Scott and S.J. Palmer. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. Applied Microbiology and Biotechnology, 33 :221-225, 1990.
- [70] C. Rensing and R.M. Maier. Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. Ecotoxicol. Environ. Saf., 56 :140-147, 2003.
- [71] Caland, F. (2013). Décomposition tensorielle de signaux luminescents émis par des biosenseurs bactériens pour l'identification de systèmes Métaux-Bactéries (Thèse de doctorat, Université de Lorraine). <https://theses.hal.science/tel-01749867>
- [72] Roointan, A., Mohkam, M., Seyedjafari, E., Amini, M., & Shokrgozar, M. A. (2015). Designing a bacterial biosensor for detection of mercury in water solutions. Biological Journal

of Microorganism, 4(15), 41-

50.<https://www.researchgate.net/publication/280610544> Designing a bacterial biosensor for detection of mercury in water solutions

[73] Liu, X., Germaine, K. J., Ryan, D., & Dowling, D. N. (2010). Whole-cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls. Sensors, 10(2), 1377–1398. <https://doi.org/10.3390/s100201377>

[74] Valenzuela-García, C., Vences-Guzmán, M. A., Curiel-Quesada, E., Martínez-Laguna, Y., & Gutiérrez-Corona, J. F. (2023). Design of a Whole-Cell Biosensor Based on Bacillus subtilis Spores and GFP to Monitor Arsenic. Microbiology Spectrum, 11(3), e00432-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00432-23>

[75] Close, D. M., Patterson, S. S., Ripp, S., Baek, S. J., Sanseverino, J., & Sayler, G. S. (2011). The evolution of bioluminescent reporters in bacteria for environmental and medical applications. Current Opinion in Biotechnology, 22(1), 71–79.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.002>

[76] Vestergaard, M., Leng, B., & Haagensen, J. A. (2007). Bacterial biosensors: Detection of chemicals and bacteria. Biosensors and Bioelectronics, 22(8), 1285–1293.

[77] Xu, T., Close, D. M., Sayler, G. S., & Ripp, S. (2016). Genetically engineered bioluminescent bacterial sensors for environmental monitoring and medical diagnostics. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408(1), 207–217.

[78] Contag, C. H., & Bachmann, M. H. (2002). Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. Annual Review of Biomedical Engineering, 4, 235–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125958>

[79] Capin, J., Chabert, E., Zuñiga, A., & Bonnet, J. (2024). Microbial biosensors for diagnostics, surveillance and epidemiology: Today's achievements and tomorrow's prospects. Microbial Biotechnology, 17(11), e70047. enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com

[80] Fazel, M., Grussmayer, K. S., Ferdman, B., Radenovic, A., Shechtman, Y., Enderlein, J., & Pressé, S. (2023). Fluorescence Microscopy: a statistics optics perspective. arXiv. arxiv.org

- [81] Fournier, L. (2025, 13 avril). « Nous faisons parler les bactéries à la vitesse de la lumière » : le MIT relie des drones aériens à des signaux chimiques grâce à des microbes luminescents. Innovant. <https://www.innovant.fr/2025/04/13/nous-faisons-parler-les-bacteries-a-la-vitesse-de-la-lumiere-le-mit-relie-des-drones-aeriens-a-des-signaux-chimiques-grace-a-des-microbes-luminescents/>
- [82] Kong, W., Chemla, Y., Levin, I., Fan, Y., Johnson, A., Coley, C. W., & Voigt, C. A. (2025). Hyperspectral reporters for remote detection of bacterial sensors. *Nature Biotechnology*, 43(4), 456–462. <https://doi.org/10.1038/s41587-025-02668-y>
- [83] Park, S., Lee, J., Kim, J., & Cho, Y. (2022). Microfluidic-integrated bacterial bioluminescent biosensor for rapid cadmium detection in water. *Biosensors and Bioelectronics*, 196, 113735. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113735>
- [84] Zhang, Y., & Yin, K. (2021). Lab-on-a-chip platforms for bacterial biosensors: Advances and future directions. *Trends in Biotechnology*, 39(12), 1320–1332. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.05.003>
- [85] Chen, C., & Wang, P. (2023). Microfluidic platforms for whole-cell bacterial biosensors: Advances, challenges, and future prospects. *Lab on a Chip*, 23(2), 321–336. <https://doi.org/10.1039/D2LC00876E>
- [86] Olaniran, A. O., & Pillay, B. (2021). Stability of whole-cell biosensors for environmental applications: preservation strategies and current challenges. *Biosensors*, 11(8), 259. <https://doi.org/10.3390/bios11080259>
- [87] Berna, A., et al. (2023). Preserving biosensor bacteria for field use: advances in lyophilization and encapsulation techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107, 2225–2236. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12587-7>
- [88] Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>

- [89] Kumar, R., Singh, P., & Gupta, N. (2021). Immobilization of bacterial biosensors for environmental monitoring: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101321. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101321>
- [90] Pannier, A., Soltmann, U., Soltmann, B., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2014). Alginate/silica hybrid materials for immobilization of green microalgae Chlorella vulgaris for cell-based sensor arrays. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(45), 7896–7909. <https://doi.org/10.1039/c4tb00944d>
- [91] Schmidt-Dannert, C., & Lopez-Gallego, F. (2016). Cell-free biosensors: safety and modularity for environmental monitoring. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.002>
- [92] Gallagher, R. R., & Isaacs, F. J. (2018). Synthetic biology: engineering the environment. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 77–88. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.97>
- [93] Wright, O., Stan, G. B., & Ellis, T. (2013). Building-in biosafety for synthetic biology. *Microbiology*, 159(7), 1221–1235. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066308-0>
- [94] Selifonova, O., Burlage, R., & Barkay, T. (1993). Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 3083–3090.
- [95] Nagata, T., Muraoka, T., Kiyono, M., & Pan-Hou, H. (2010). Development of a luminescence-based biosensor for detection of methylmercury. *Journal of Toxicological Sciences*, 35(2), 231–234. <https://doi.org/10.2131/jts.35.231>
- [96] Nagata, T., Muraoka, T., Kiyono, M., & Pan-Hou, H. (2011). Methylmercury-specific luminescence-based biosensor using merR-merB::luxCDABE gene cassette. *Analytical Sciences*, 27(2), 197–202. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.197>
- [97] Li, Y., Zhang, M., Zhao, Y., et al. (2023). Bioavailability modeling of mercury in contaminated soils using biosensors and geochemical parameters. *Environmental Science & Technology*, 57(6), 3450–3461. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c08472>

[98] Hamedi, N. (2022). Les Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) et le principe de précaution. Revue Algérienne de Droit, 13(2), 737-755.

<https://www.asjp.cerist.dz/en/downArticle/72/13/2/209464>

[99] Infogm. (2024). Les solutions biotechnologiques du biocontrôle : des risques biologiques et écologiques ? https://infogm.org/article_journal/les-solutions-biotechnologiques-du-biocontrolle-des-risques-biologiques-et-ecologiques/

[100] Éditions de la Sorbonne. (2013). OGM et protection de la personne.

<https://books.openedition.org/psorbonne/91110?lang=fr>

[101] Manga, S.-J.-T. (1999). L'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'agriculture et l'alimentation : enjeux sociaux et perspectives de l'encadrement du droit et de l'éthique. Revue générale de droit, 30(3), 369–422. <https://doi.org/10.7202/1027708ar>

[102] Biosafety Clearing-House (BCH). (s.d.). Guide d'analyse des risques liés aux OGM. <https://bch.cbd.int/protocol/outreach/online%20forum/Guide%20analyse.pdf>

[103] Ministère de la Transition écologique. (2024, juin 12). Les organismes génétiquement modifiés(OGM).<https://www.ecologie.gouv.fr/politiques-publiques/organismes-genetiquement-modifies-ogm>

[104] Medadom. (2023, septembre 5). Les OGM sont-ils dangereux pour la santé ? <https://info.medadom.com/sante-decomplexee/ogm-sante>

[105] Vertigo. (2017). Les OGM et la recherche : science ou business ? Risques toxiques et environnementaux. <https://journals.openedition.org/vertigo/4070?lang=fr>

[106] IUCN. (s.d.). Organismes génétiquement modifiés et sécurité biologique.

https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/PGC-001_Fr.pdf

[100] Éditions de la Sorbonne. (2013). OGM et protection de la personne.

<https://books.openedition.org/psorbonne/91110?lang=fr>

- [101] Manga, S.-J.-T. (1999). L'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'agriculture et l'alimentation : enjeux sociaux et perspectives de l'encadrement du droit et de l'éthique. *Revue générale de droit*, 30(3), 369–422. <https://doi.org/10.7202/1027708ar>
- [102] Biosafety Clearing-House (BCH). (s.d.). Guide d'analyse des risques liés aux OGM. <https://bch.cbd.int/protocol/outreach/online%20forum/Guide%20analyse.pdf>
- [103] Ministère de la Transition écologique. (2024, juin 12). Les organismes génétiquement modifiés (OGM). <https://www.ecologie.gouv.fr/politiques-publiques/organismes-genetiquement-modifies-ogm>
- [104] Medadom. (2023, septembre 5). Les OGM sont-ils dangereux pour la santé ? <https://info.medadom.com/sante-decomplexee/ogm-sante>
- [105] Vertigo. (2017). Les OGM et la recherche : science ou business ? Risques toxiques et environnementaux. <https://journals.openedition.org/vertigo/4070?lang=fr>
- [106] IUCN. (s.d.). Organismes génétiquement modifiés et sécurité biologique. https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/PGC-001_Fr.pdf

Annexes

Annexe 1

Exemple des systèmes à deux composants (TCS)

TCS	Biosenseur	Application
1. PhoR/PhoB → Détection du phosphate	Promoteur <i>pstS</i> fusionné à GFP → la fluorescence indique une carence en phosphate.	Surveillance de la fertilité des sols, qualité de l'eau.
2. NarX/NarL → Détection de nitrate/nitrite	PnarG: <i>lux</i> (production de lumière).	Détection de pollution agricole (engrais), contrôle de la qualité de l'eau.
3. CusS/CusR → Détection du cuivre et de l'argent	PcusC: GFP.	Application : détection de métaux lourds dans l'eau ou les sols contaminés.

Annexe 2

Objectif de développement durable

Numéro ODD	Intitulé
ODD 6	Eau propre et assainissement
ODD 12	Consommation et production responsables
ODD 13	Action climatique
ODD 14	Vie aquatique
ODD 15	Vie terrestre

Annexe 3

Composition des milieux LB, M9 et MOPS

Milieu	Composition	Quantité
LB (Luria-Bertani)	<ul style="list-style-type: none"> - Tryptone (peptone) - Extrait de levure - NaCl 	<ul style="list-style-type: none"> - 10 g - 5g - 10g
M9	<ul style="list-style-type: none"> - Na / HPO - KH / PO - NaCl - NH / Cl - MgSO (1M) - CaCl (0,1 M) - Glucose (source de C) 	<ul style="list-style-type: none"> - 6,78 g - 3,0 g - 0,5 g - 1 ,0 g - 1 mL - 0,1 mL - 2 g ou (0,2 %)
MOPS	<ul style="list-style-type: none"> - MOPS (tampon) - Tricine - KH / PO - NH / Cl - MgSO - CaCl - FeSO - Glucose 	<ul style="list-style-type: none"> - 40 mM - 4 mM - 1,32 mM - 9,52 mM - 0,52 mM - 0,15 mM - 0,01 mM - 2 g/L ou (0.2%)

<p>Année universitaire : 2024-2025</p>	<p>Présenté par : Lemoufek Malak Makhloifi Djihene Hanachi Amina Racha</p>
<p>Les biosenseurs bactériens : Application à la surveillance environnementale.</p>	
<p>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie moléculaire des microorganismes.</p>	
<p>Résumé</p>	
<p>Les biosenseurs bactériens représentent une technologie innovante et prometteuse pour la surveillance environnementale. Ces dispositifs utilisent des bactéries vivantes, le plus souvent génétiquement modifiées, pour détecter et signaler la présence de polluants, de métaux lourds et d'autres substances nocives avec une haute sensibilité et spécificité, comparativement aux méthodes traditionnelles, offrant des solutions efficaces et respectueuses de l'environnement. Apparus dans les années 1980 avec l'introduction des gènes <i>lux</i>, ces biosenseurs ont bénéficié des progrès en biologie moléculaire et en génie génétique. Leur conception repose sur des techniques de transformation bactérienne et l'intégration de systèmes rapporteurs optimisés par des outils modernes comme le clonage Gibson ou CRISPR-Cas. Les biosenseurs bactériens fonctionnent en utilisant des bactéries équipées de gènes rapporteurs et de transducteurs leur permettant la conversion de la réponse biologique en un signal mesurable, tel que la fluorescence ou la bioluminescence, en réponse à un stimulus spécifique. Malgré leurs nombreux avantages, ils font face à des défis d'ordres techniques, environnementaux et réglementaires. Toutefois, l'intégration de nanotechnologies, de microfluidique et d'approches multidisciplinaires ouvre des perspectives prometteuses pour leur développement futur.</p>	
<p>Mots-clés : Biosenseurs bactériens, surveillance environnementale, bactéries génétiquement modifiées, détection des contaminants.</p>	
<p>Président du jury : Boubekri Karima (PROF / MC(A) – Uni. Frères Mentouri Constantine 1).</p>	
<p>Encadrant : Boultifat Linda (MA(B) / MA(A) / MC(B) / MC(A) / PROF - UFM Constantine 1).</p>	
<p>Examinateur(s) : Mergoud Lilia (MA(B) / MA(A) / MC(B) / MC(A) / PROF - UFM Constantine 1).</p>	