

# Des biosenseurs bactériens pour la détection de l'arsenic dans l'eau potable

**L'arsenic est l'un des polluants inorganiques de l'eau potable les plus préoccupants de par le monde. La situation est particulièrement alarmante au Bangladesh où plus d'un million de personnes présentent déjà des signes d'empoisonnement. Pour être en mesure d'analyser l'eau des quelque 9 millions de puits privés du pays, il est besoin d'une méthode de terrain qui soit à la fois peu onéreuse, fiable et suffisamment sensible. Pour répondre à ces besoins, une équipe de l'EAWAG a mis au point une méthode de dosage de l'arsenic reposant sur un biosenseur spécifique. Ce test à bandes de papier indicateur fait appel à des bactéries génétiquement modifiées qui produisent une coloration bleue en présence de faibles concentrations d'arsenic. L'EAWAG a déposé une demande de brevet pour cette innovation.**

L'arsenic inorganique est un polluant commun de l'eau potable fort répandue dans le monde entier [1–3]. Etant généralement d'origine géochimique, les arsénates et arsénites peuvent se trouver dans les eaux souterraines à des concentrations allant jusqu'à 1 à 2 mg par litre. La plupart des pays admettent pour l'arsenic un seuil de toxicité dans l'eau potable situé entre 10 et 50 µg par litre. Même à des concentrations de l'ordre de 50 µg par litre, une exposition chronique à l'arsenic provoque ou augmente le risque de contracter des arsénoses et des cancers induits par l'arsenic. Il est donc primordial que les eaux contenant de l'arsenic ne soient pas utilisées pour la consommation. Malheureusement, cer-

taines régions du monde connues pour leur très forte exposition à l'arsenic dans l'eau potable, comme le Bangladesh et le Vietnam, font partie de celles qui disposent de l'infrastructure scientifique la plus faible [1, 2]. D'autre part, la distribution d'eau potable de ces deux pays est gérée de manière locale, la plupart des ménages disposant de leur propre captage. Etant donné que l'on sait maintenant qu'il est très difficile d'estimer précisément le degré de contamination des différents captages parce que les concentrations d'arsénites présentent de fortes variations stationnelles et saisonnières, l'analyse détaillée de la qualité de l'eau potable est un élément capital de la stratégie de lutte contre la contamination

par l'arsenic, du moins tant qu'il n'existe pas de méthode efficace d'élimination de ce polluant.

## Dosage de l'arsenic

L'arsenic est traditionnellement dosé par colorimétrie, p. ex. par la méthode au bromure mercurique. Cette méthode à la base de nombreux kits de mesure sur le terrain s'est cependant avérée inefficace pour des concentrations inférieures à 70 µg par litre et s'accompagne en outre d'une libération d'arsine gazeuse et de métaux lourds (Zn, Hg, Sn). Par contre, le dosage de l'arsenic par spectrophotométrie d'absorption atomique ou par spectroscopie de fluorescence atomique est très précis et absolument fiable, mais nécessite des moyens financiers considérables. C'est pour pallier cette situation que l'EAWAG a mis au point un test simple, précis et bon marché faisant appel à des bactéries génétiquement modifiées servant de biosenseurs pour la détection de l'arsenic. Comment cela a-t-il été possible?

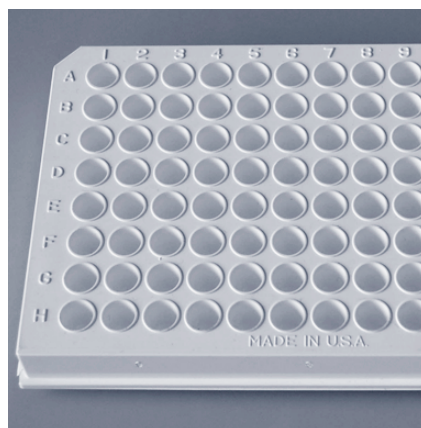
## L'idée d'exploiter les mécanismes naturels de défense des bactéries contre l'arsenic

L'arsenic n'est pas uniquement toxique pour les êtres humains et les animaux. Sa toxicité a également été constatée chez des organismes primitifs tels que les bacté-



Photos: J.P. van der Meer, EAWAG

Les cellules bactériennes du biosenseur luminescent doivent être impérativement conservées au frais.



Les cellules sont transférées dans une plaque de microtitration renfermant différents échantillons d'eau.



Le luminomètre permet de mesurer l'importance de la contamination des échantillons d'eau par de l'arsenic.

ries. Celles-ci disposent de quelques mécanismes biochimiques relativement efficaces pour neutraliser les ions arsénites et arsénates qui pénètrent dans la cellule (Fig. 1). Deux protéines bactériennes bien connues se chargent de ces deux formes d'arsenic. La première est une pompe intégrée dans la paroi cellulaire bactérienne qui expulse tout arsénite rencontré dans la cellule vers l'extérieur où il ne peut plus causer de dommages. La seconde protéine est appelée «arséniate réductase» et réduit les arsénates en arsénites.

Une autre protéine est nécessaire pour que la réaction de défense se déclenche dès que de l'arsenic est présent au sein de la cellule. Cette protéine appelée ArsR est une sorte de détecteur d'arsenic. Elle peut se fixer de deux manières différentes: en l'absence d'arsenic, elle est fixée sur un élément spécifique de l'ADN et empêche la transcription des gènes de défense contre l'arsenic par l'appareil de transcription (Fig. 1). Cette répression n'est cependant pas totale et de petites quantités d'ArsR, d'arséniate réductase et de pompe à arsénites sont toujours présentes. Quand de l'arsénite pénètre dans la cellule, l'ArsR change de comportement; elle vient immédiatement se fixer sur le composé arsénié et perd son affinité pour le site de l'ADN dont elle se détache. Le mécanisme de défense

n'est donc plus inhibé par l'ArsR et la cellule produit une quantité accrue de pompes à arsénites et d'arséniate réductases.

Pour mettre au point le biosenseur à arsenic, nous avons tiré profit des propriétés biochimiques de l'ArsR. A la seule différence que notre but n'était pas de déclencher le mécanisme de défense mais plutôt la production d'autres protéines ou enzymes faciles à détecter quand la cellule entre en contact avec les arsénites. C'est là que le génie génétique entre en jeu. Des manipulations génétiques permettent de transformer les bactéries de manière à ce qu'elles produisent une réaction lumineuse ou un signal fluorescent ou encore une réaction colorimétrique quand elles se trouvent en présence d'arsénites [4]. Nous avons donc relié entre eux le gène codant pour l'ArsR, le site fixateur de l'ArsR sur l'ADN et un gène rapporteur codant pour une enzyme lumineuse, la luciférase (Fig. 1). Après avoir introduit cette construction génétique dans des cellules d'*Escherichia coli*, le biosenseur était en principe prêt [5].

### Un biosenseur luminescent très sensible en suspension liquide

Comment utiliser le nouveau biosenseur bactérien? Sous leur forme la plus simple, les cellules de biosenseur sont cultivées dans un milieu nutritif liquide jusqu'à ce que

la culture atteigne une densité d'environ  $2 \times 10^8$  cellules par ml. Les bactéries sont alors collectées et remises en suspension dans une solution saline de glycérol puis réparties en aliquotes et congelées à  $-80^\circ\text{C}$ . De telles aliquotes restent viables pendant plus de 5 ans. Pour effectuer un test, les aliquotes sont décongelées, diluées avec du milieu de culture frais pour ranimer les cellules et mélangées avec l'échantillon d'eau à analyser. On procède parallèlement à un étalonnage du système à l'aide de solutions standards de concentrations connues en arsénites allant de 0 à  $0,5 \mu\text{M}$  (entre 0 et  $40 \mu\text{g}$  d'arsenic par litre). Il est possible d'analyser des volumes d'eau très faibles puisque le volume minimal du mélange ne doit être que de  $200 \mu\text{l}$ . D'autre part, de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément. Pour l'analyse, les cellules sont mises en incubation à  $30^\circ\text{C}$  pendant au moins 30 minutes, le temps nécessaire à la production de luciférase bactérienne. Après incubation, une goutte de substrat spécifique de la luciférase (n-décanal) est ajoutée à la solution et l'émission lumineuse est mesurée dans un luminomètre. La courbe d'étalonnage obtenue avec ces cellules de biosenseur est en général linéaire dans le domaine de concentration en arsénites compris entre 0 et  $0,5 \mu\text{M}$  (Fig. 2). Pour des concentrations plus élevées ou

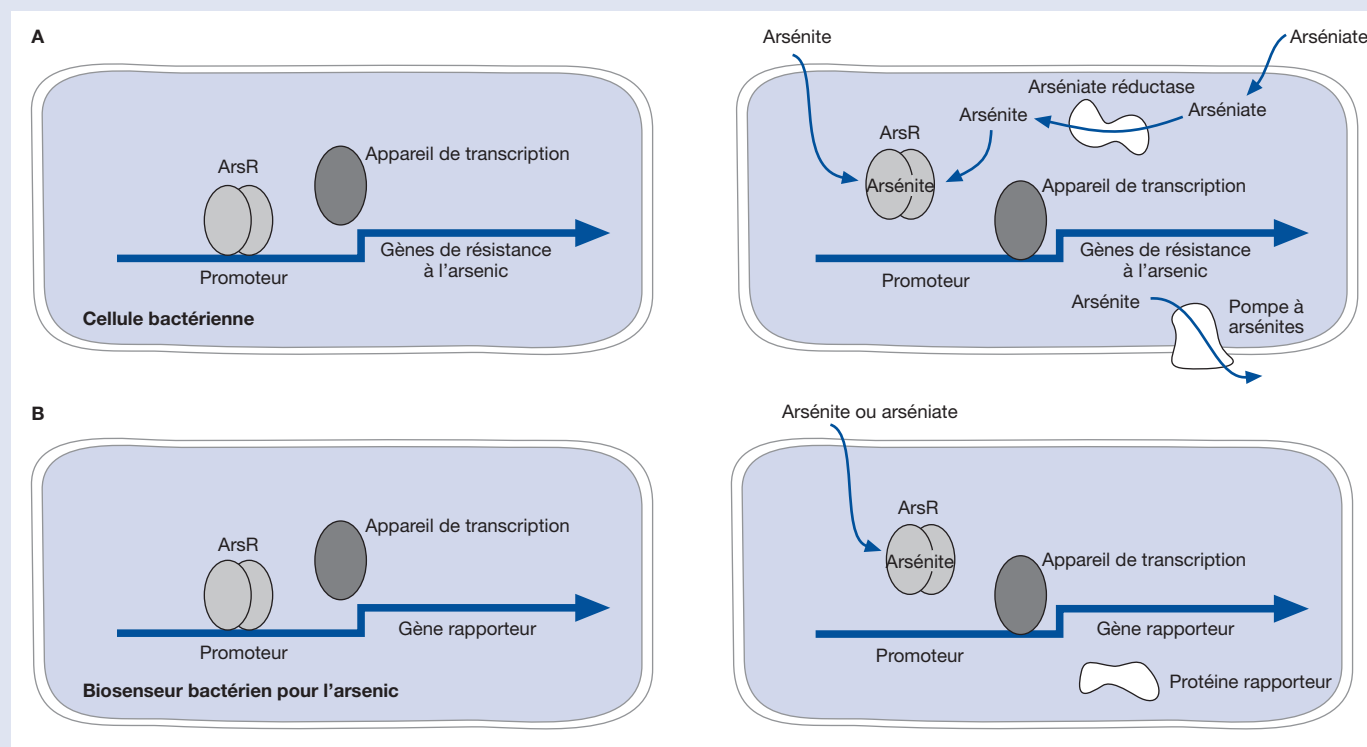


Fig.1: Principe de la défense contre l'arsenic chez les bactéries (A) et des biosenseurs à arsenic (B). La protéine de régulation ArsR se fixe sur une zone spécifique de l'ADN et inhibe l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans les mécanismes de défense contre l'arsenic. Quand les arsénites pénètrent ou sont formées dans les cellules, ils se fixent aux ArsR qui se détachent de l'ADN alors à nouveau accessible à l'appareil de transcription. Les gènes de résistance à l'arsenic (codant pour l'ArsR elle-même, pour la pompe à arsénites et pour l'arséniate réductase) ou le gène rapporteur (codant pour la luciférase, la «Green Fluorescent Protein» ou la  $\beta$ -galactosidase) sont alors exprimés.

pour des solutions inconnues, il est nécessaire de procéder à des dilutions permettant de se placer dans le domaine de linéarité pour obtenir des résultats précis.

## Un biosenseur plus simple à bandes de papier indicateur

La méthode décrite plus haut n'est pas assez simple pour le terrain et limite son utilisation au laboratoire. Il y a pour cela deux raisons principales: d'une part, elle nécessite l'utilisation d'un luminomètre qui est un appareil relativement onéreux, et d'autre part, la manipulation des cultures bactériennes en milieu liquide est trop délicate pour le terrain. C'est pourquoi nous avons tenté de mettre au point un autre système de biosenseur dans lequel les cellules bactériennes génétiquement modifiées seraient immobilisées sur une bande de papier indicateur. A la place du gène rapporteur de la luciférase, ce second système comprend un gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, une enzyme qui produit une réaction colorée, ici en présence d'arsenic. Ces cellules de biosenseur sont comme précédemment tout d'abord cultivées en milieu liquide, mais sont placées après collecte dans une solution contenant divers sucres et acides aminés ainsi que de la gélatine. De petites quantités de ce mélange sont alors déposées sur des bandes de papier (Fig. 3) qui sont ensuite précautionneusement séchées à température contrôlée et sous vide partiel. Les cellules fixées sur les bandes de papier restent actives pendant environ 1 mois si elles sont stockées entre  $-20$  et  $30$  °C. Pour réaliser un test colorimétrique, il suffit de placer une bande de papier indicateur dans un flacon contenant 1 ml d'échantillon à analyser et de la laisser incuber pendant 30 minutes à  $30$  °C avant de la retirer. On dépose alors sur le papier une goutte de substrat spécifique de la  $\beta$ -galactosidase et on obtient une coloration bleue dont l'intensité dépend de la quantité de  $\beta$ -galactosidase.

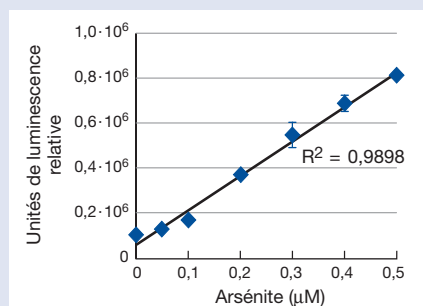


Fig. 2: Exemple de courbe d'étalonnage pour le biosenseur à luciférase. Des concentrations croissantes d'arsénites (allant de  $0,05$  à  $0,5$   $\mu\text{M}$ ) induisent une augmentation linéaire de la luminescence produite par les cellules de biosenseur.

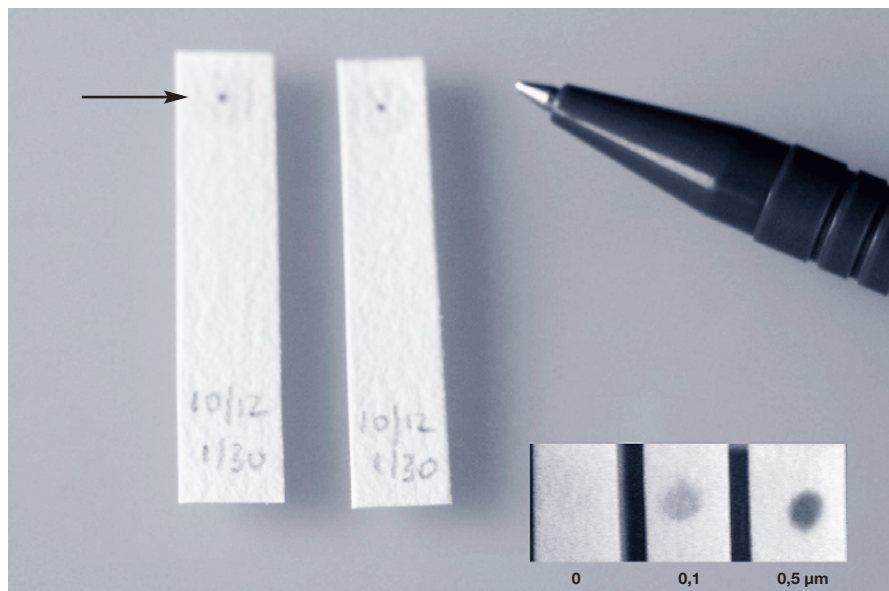


Fig. 3: Le test de détection de l'arsenic par papier indicateur: bandes de papier ( $4 \times 0,5$  cm) portant des taches de cellules bactériennes desséchées (flèche). Après incubation dans des échantillons d'eau arsénifiée, les cellules produisent de la  $\beta$ -galactosidase. L'activité de cette enzyme est rendue visible par la conversion de son substrat en une molécule de couleur bleue (encart). L'intensité de la coloration dépend de la concentration en arsénites.

dase. L'intensité de la coloration donne une mesure qualitative de la quantité d'arsenic à laquelle ont été exposées les cellules. Si l'on compare cette indication à celle donnée par une solution standard contenant 10 ou  $50$   $\mu\text{g}$  d'arsenic par litre, on peut estimer si la concentration de l'échantillon se situe au-dessus ou en dessous du seuil fixé pour l'eau potable (Fig. 3). Le papier indicateur au biosenseur donne donc un résultat moins précis que le biosenseur liquide dont il ne possède pas non plus la longue durée de conservation, mais il semble mieux adapté à une utilisation sur le terrain.

## Questions en suspens

Voilà pour les aspects techniques. Des questions et problèmes importants restent à régler avant que le biosenseur puisse être utilisé pour des analyses de routine sur le terrain. Par exemple, comment garantir la qualité des cellules de biosenseur (c'est-à-dire leur potentiel d'activation immédiate)? Quelle est la qualité des résultats du biosenseur par rapport aux analyses chimiques? La composition chimique des échantillons d'eau a-t-elle une influence sur les résultats du test? Les autorités locales des pays en voie de développement sont-elles assez bien formées pour manier correctement le biosenseur? Qu'advient-il des bactéries génétiquement modifiées après le test? C'est en procédant pas à pas que l'on pourra apporter des réponses aux questions encore en suspens. L'EAWAG a déposé une demande de brevet auprès de l'Office européen des brevets. De plus, l'EAWAG est à la recherche de partenaires industriels poten-

tiels qui seraient disposés à acquérir une licence à la technologie du biosenseur à arsenic et à financer les développements futurs. Les nouvelles améliorations et tests effectués sur les biosenseurs permettront, espérons-le, d'obtenir une comparaison réaliste des résultats des tests à biosenseurs et des méthodes d'analyse chimique ainsi que de leurs champs d'application.

Jan Roelof van der Meer, voir portrait page 8.

Coauteur: Judith Stocker

- [1] Hug S., Wegelin M., Gechter D., Canonica L. (2001): Eaux souterraines arsenicales: une catastrophe pour le Bangladesh. EAWAG news 49, 18–20.
- [2] Berg M. (2002): De l'arsenic dans l'eau potable – le Vietnam nouveau point de mire. EAWAG news 53, 12–14.
- [3] Pfeifer H.-R., Zobrist J. (2002): De l'arsenic dans l'eau potable – la Suisse également concernée? EAWAG news 53, 15–17.
- [4] Jaspers M.C.M., Totevova S., Demnerova K., Harms H., van der Meer J.R. (1999): The use of whole-cell living biosensors to determine the bioavailability of pollutants to microorganisms. In: Bavaye P., Block J.C., Goncharuk V.V. (eds.) Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 153–158.
- [5] Stocker J., Balluch D., Gsell M., Harms H., Feliciano J., Daunert S., Malik K.A., van der Meer J.R. (2003): Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid field measurements of arsenite and arsenate in potable water. Environmental Science & Technology 37, 4743–4750.