

# MISE EN PLACE D'UN BIOCAPTEUR À ADN POUR LA DÉTECTION DE *VIBRIO*



CAROLINE COMBY

PROMOTION 2015-2017

STAGE DE 2<sup>ÈME</sup> ANNÉE

DATE : DU 28 AVRIL 2017 AU 23 JUIN 2017



Laboratoire de recherche Biocapteurs-Analyses-Environnement

Responsables de stage : Lise Barthelmebs – Elise Da-Silva

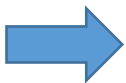




- Genre *Vibrio* :  
Bactéries Gram –  
Ubiquitaires dans les environnements aquatiques
- Emergence ou réémergence

• Pathogènes de l'Homme et des organismes marins

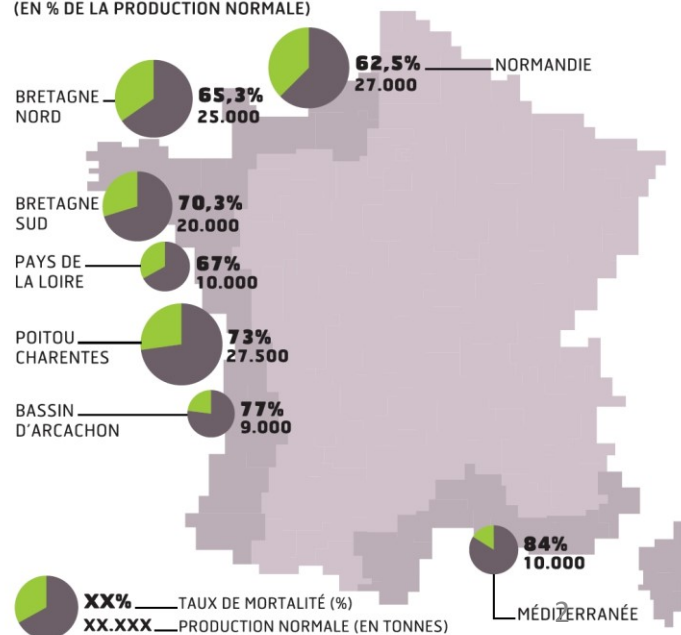
• Mortalité des huîtres sur les côtes françaises



Nécessité de suivre l'évolution des *Vibrio* directement dans l'environnement

**MORTALITÉ DES HŪÎTRES SUR LE LITTORAL FRANÇAIS**

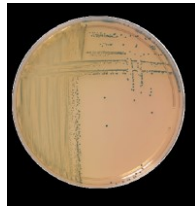
TAUX DE MORTALITÉ 2010 SUR LES HŪÎTRES JUVÉNILES  
(EN % DE LA PRODUCTION NORMALE)



## Méthodes d'analyse disponibles

### Culture

- Simple
- Peu coûteuse



- Longue
- Problème des bactéries VNC\*

### PCR / qPCR

- Sensible, spécifique
- Rapide



- Faux positifs (cellules mortes détectées)
- Faux négatifs (inhibition *Taq*Polymérase)

### Biocapteur

- Peu coûteuse
- Rapide
- Sensible, spécifique
- Détection en temps réel
- Innovation (peu de formats déjà disponibles)

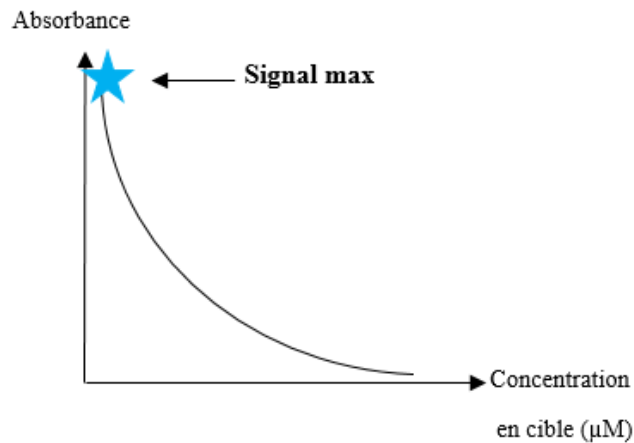
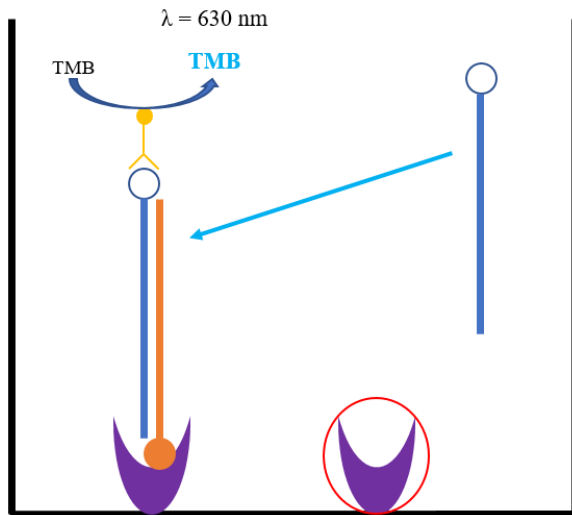


➔ Outil d'analyse choisi : biocapteur à ADN (cible : acides nucléiques)

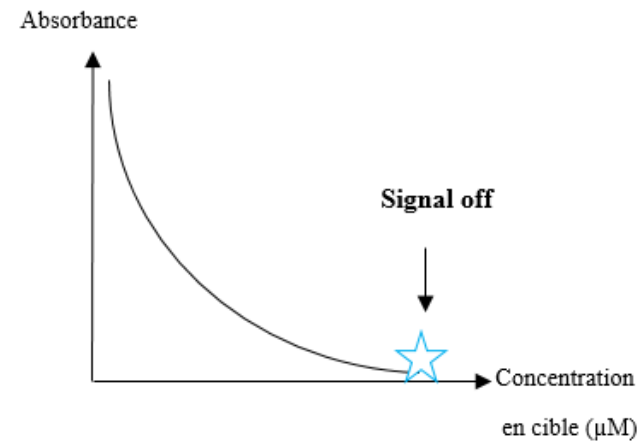
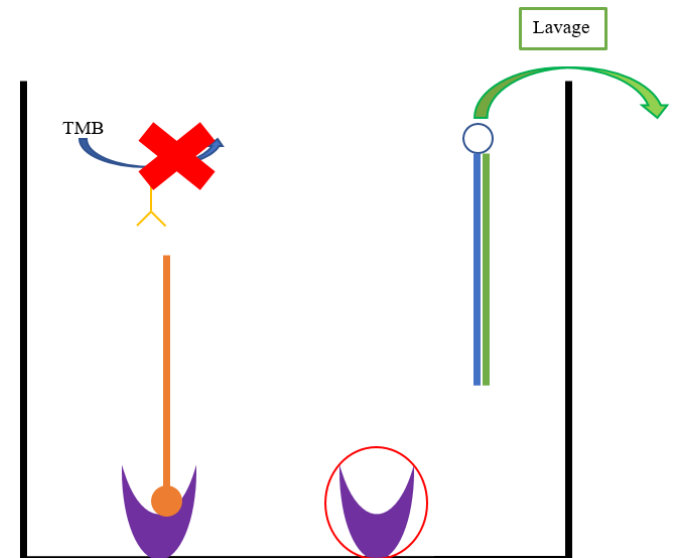
\* VNC : Viables Non Cultivables

# Biocapteur à ADN : format d'hybridation « piégeage »

Fonctionnement en **absence** de cible



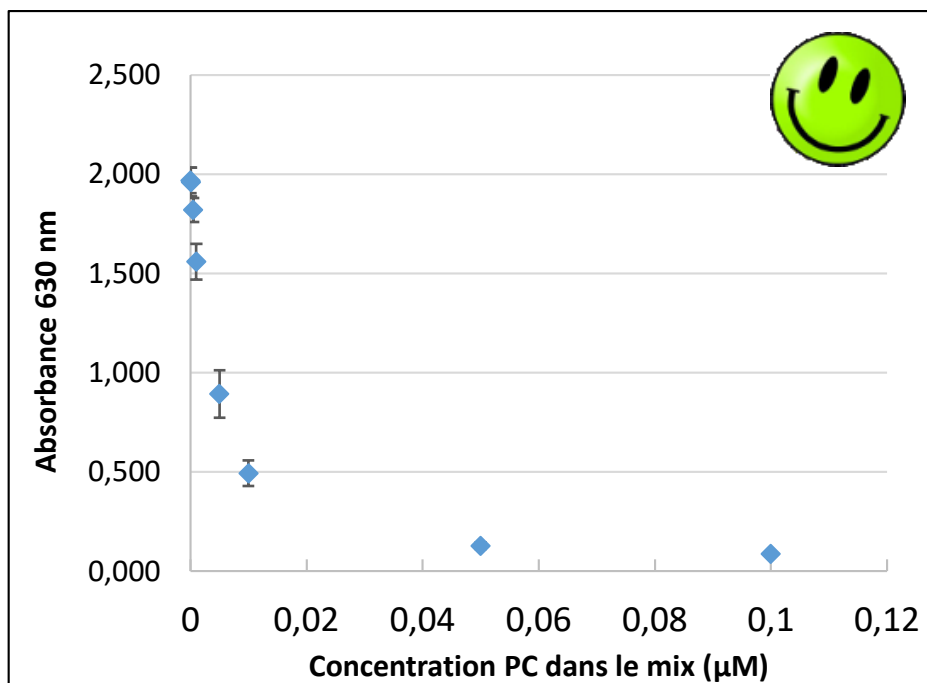
Fonctionnement en **présence** de cible



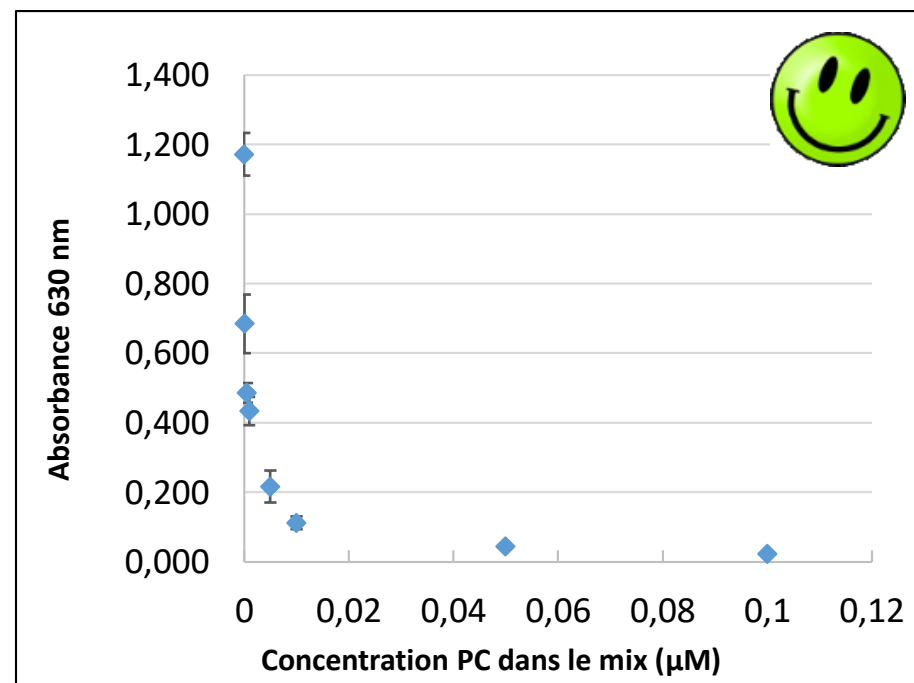
## Réalisation de courbes de calibration

Variation de la concentration en Contrôle Positif (PC)

Genre *Vibrio* spp.



Clade Splendidus parmi le genre *Vibrio*



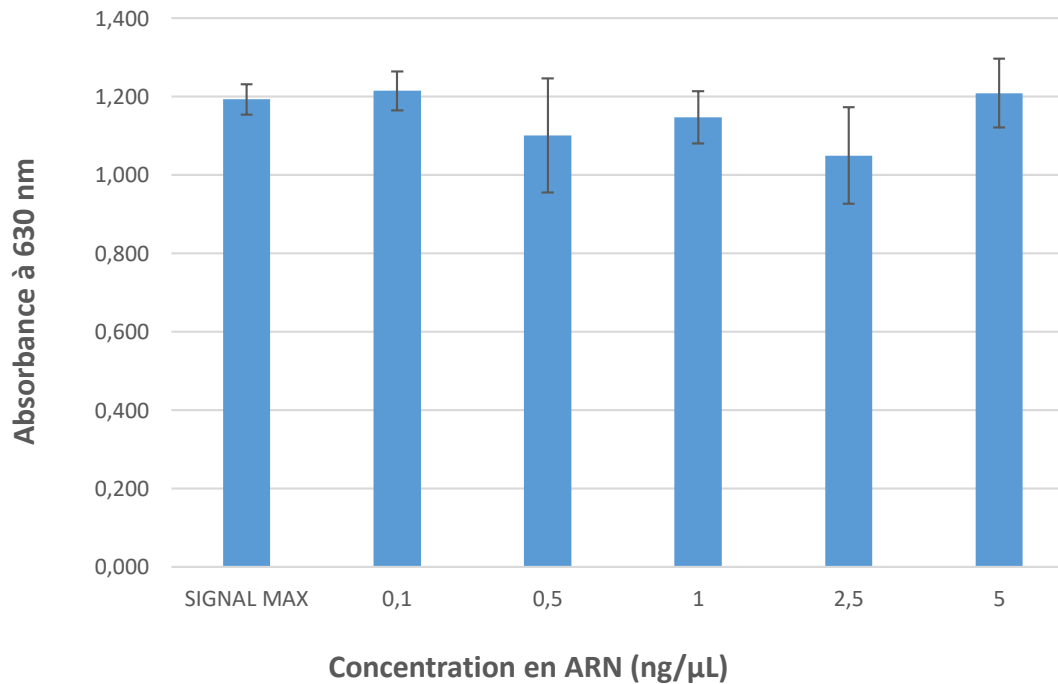
Résultats avec couple de sondes *Vibrio* spp.

## Réalisation des tests de sensibilité

Conditions expérimentales :

ARN extraits de souches pures

Gamme de concentration :  
5 à 0,1 ng/μL



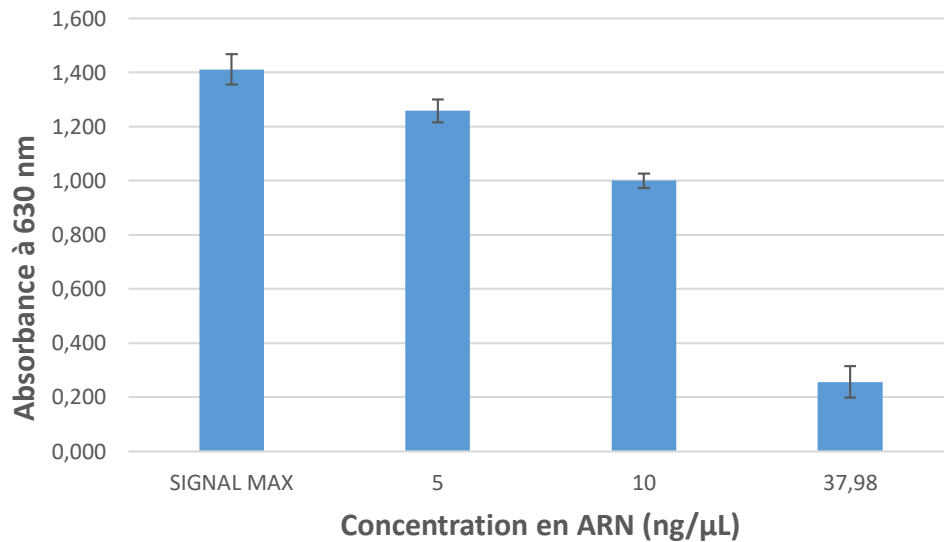
Pas de différence significative entre les différentes concentrations testées



Augmentation des concentrations testées

## Réalisation des tests de sensibilité

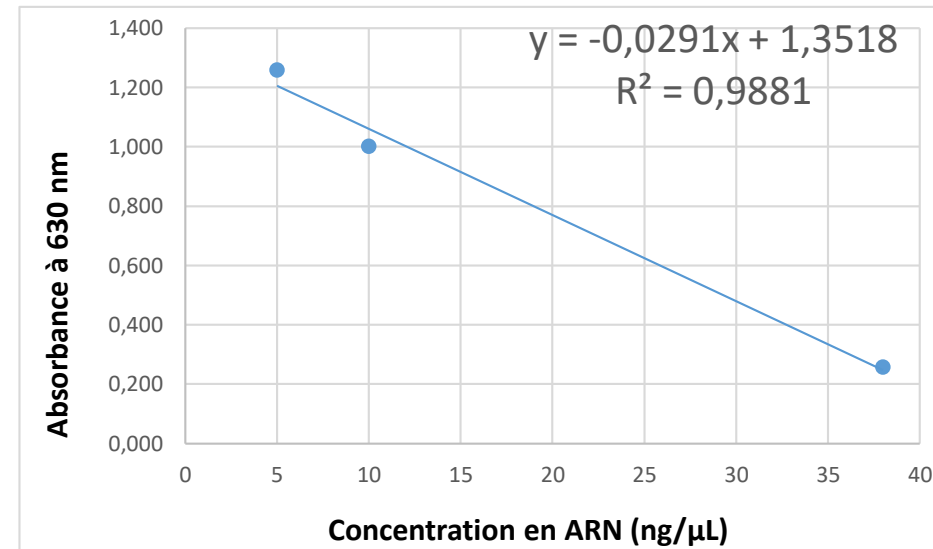
### Conditions expérimentales :



Pour [ARN] = 38 ng/μL → Diminution significative du signal : 82 %

ARN extraits de souches pures

Gamme de concentration :  
38 à 5 ng/μL



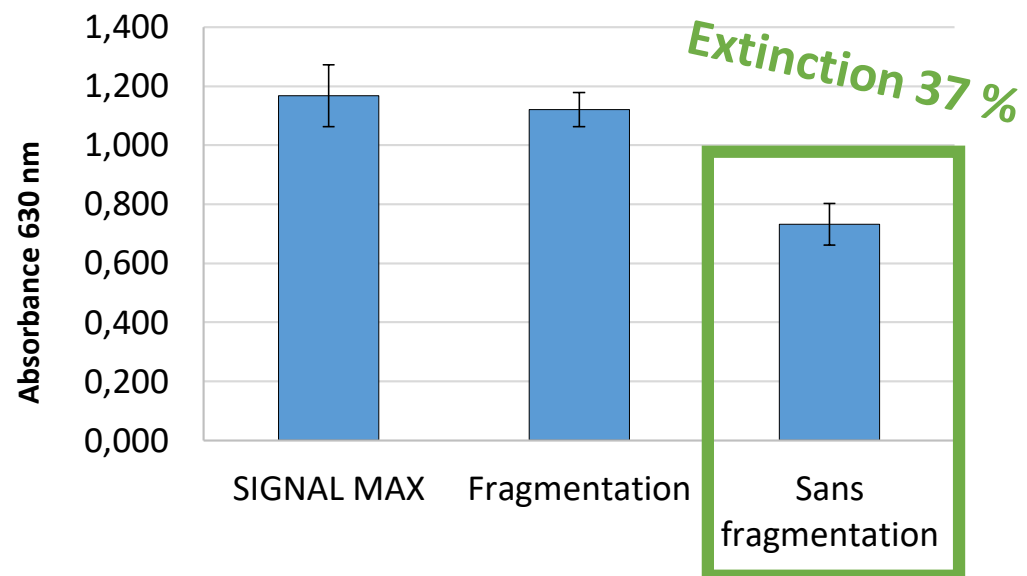
**PROBLEME** : Augmenter la concentration diminue la sensibilité du format

## Test 1 : Fragmentation de la cible

### Conditions expérimentales :

ARN extraits de souches pures

Concentration en ARN fixée :  
5 ng/ $\mu$ L



Condition optimale : ARN non fragmenté

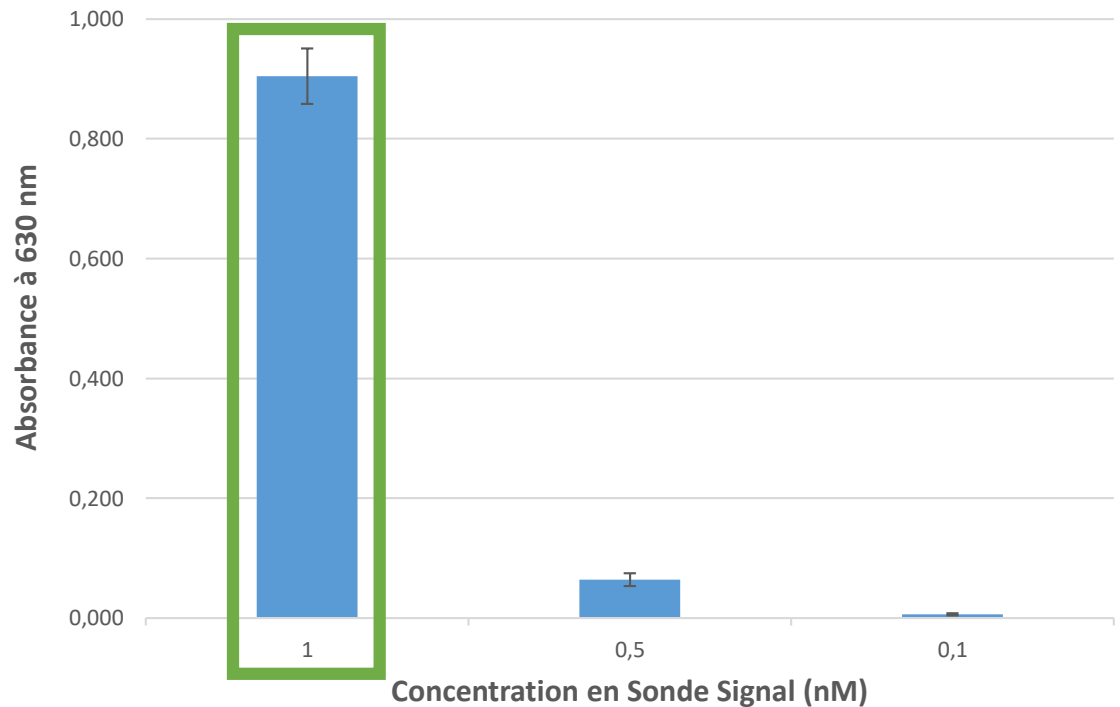


## Test 2 : Variation de la concentration en sonde signal

### Conditions expérimentales :

Concentration sonde capture fixée :  
100 nM

Absence de cible



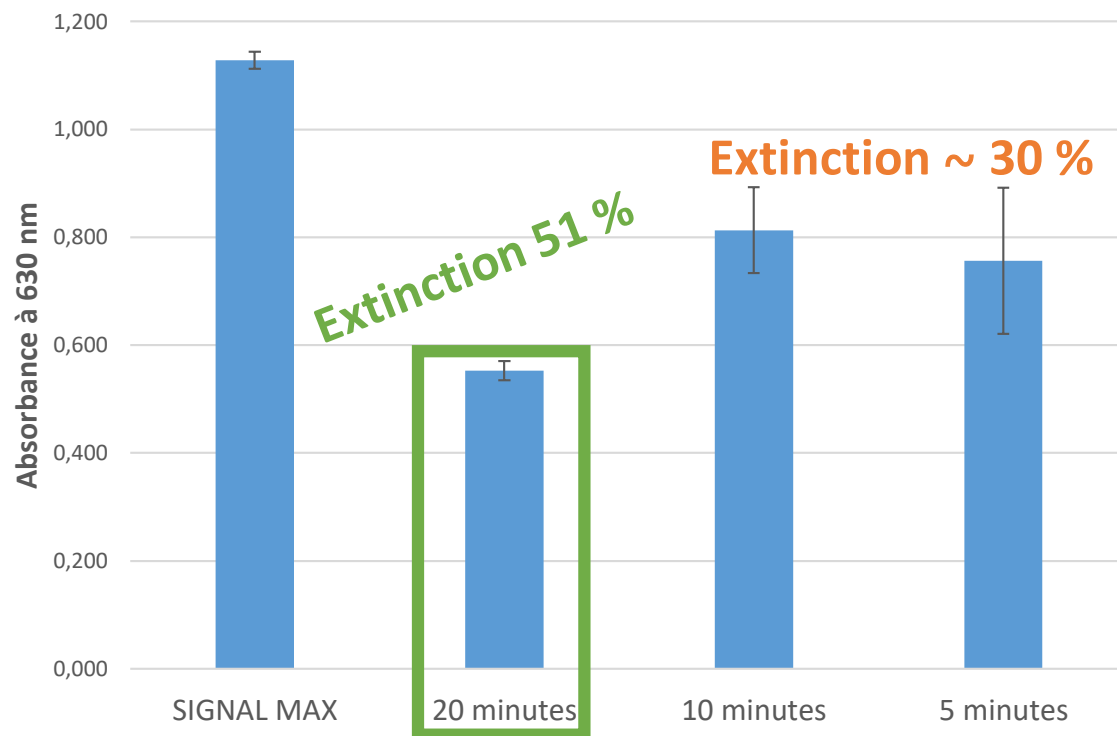
Condition optimale : [Sonde Capture] = 100 nM ; [Sonde Signal] = 1 nM

## Test 3 : Variation de la durée d'hybridation

### Conditions expérimentales :

ARN extraits de souches pures

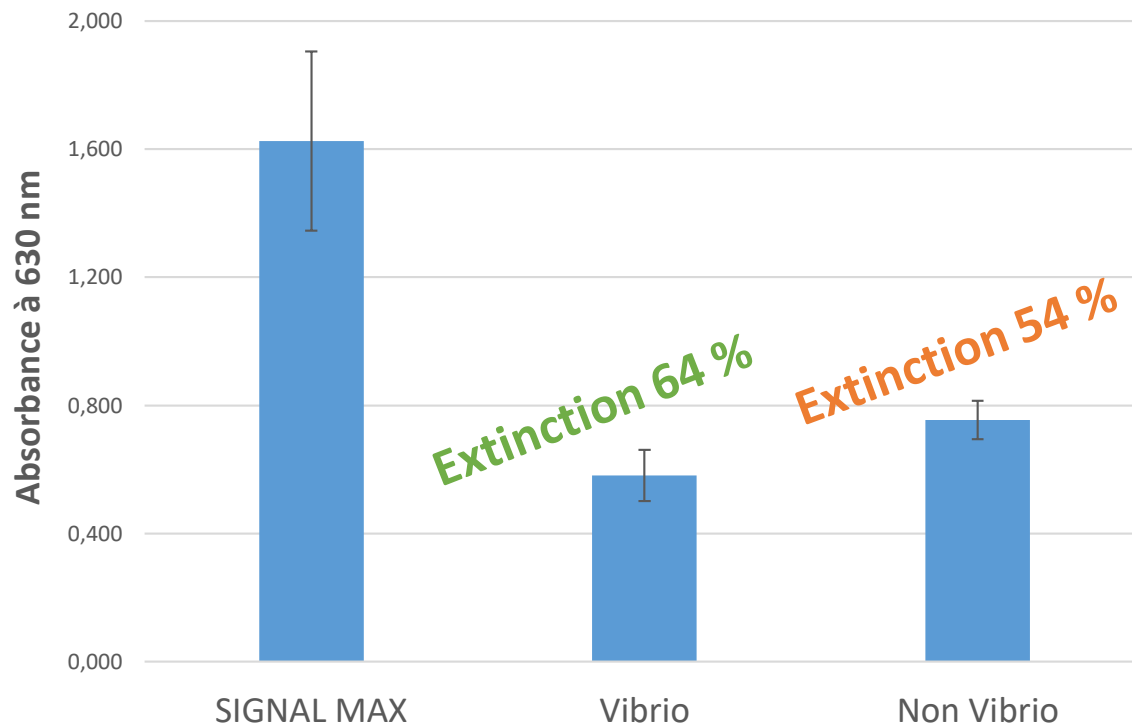
Concentration en ARN fixée :  
5 ng/ $\mu$ L



Condition optimale :

Hybridation = 20 minutes

## Réalisation des tests de spécificité sur ARN



Conditions expérimentales :

ARN extraits de souches pures

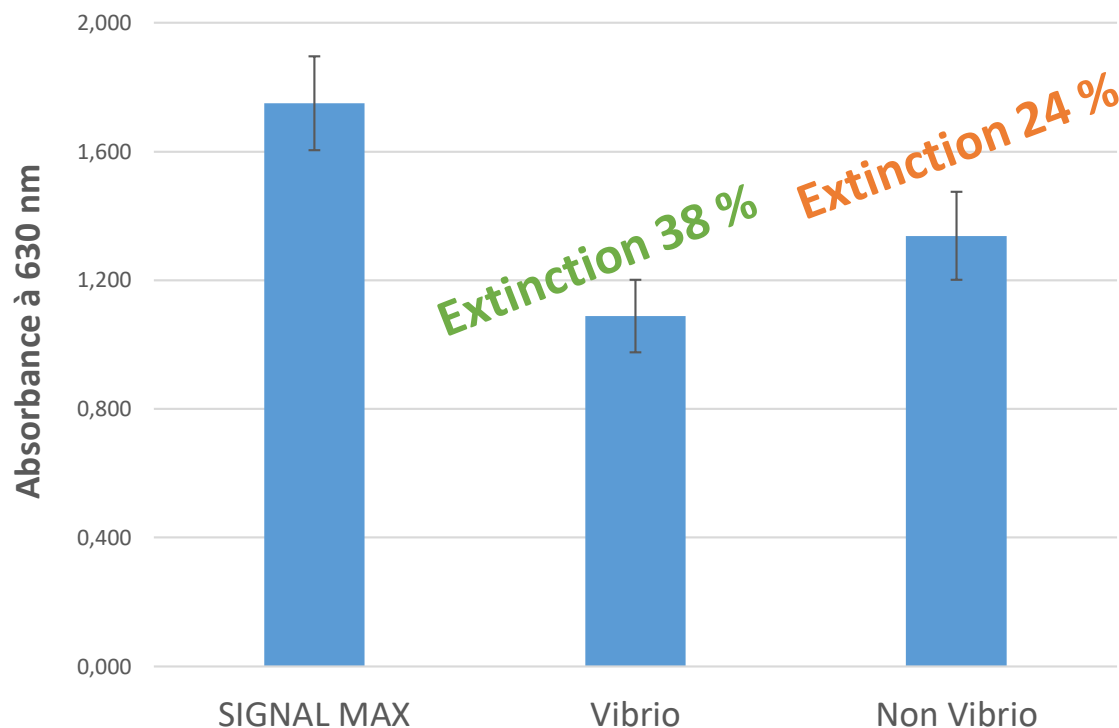
Concentration en ARN fixée :  
5 ng/ $\mu$ L

→ Différence non significative



Distinction impossible entre ARN *Vibrio* et Non *Vibrio*  
Vérifier la spécificité avec des ADN (mimer une PCR)

## Réalisation des tests de spécificité sur ADN



### Conditions expérimentales :

ADN extraits de souches pures

Concentration en ADN fixée :

[*Vibrio*] = 4,7 ng/ $\mu$ L

[Non *Vibrio*] = 4,0 ng/ $\mu$ L

→ Différence non significative



Distinction impossible entre ADN *Vibrio* et Non *Vibrio*  
Tests de spécificité à poursuivre

- Problèmes rencontrés : stabilité du marquage à la DIG  
spécificité des sondes ADN
- Tests validés : optimisation des conditions, calibration
- Tests à poursuivre : sensibilité et spécificité
- Bilan personnel



**MERCI POUR VOTRE ATTENTION**