

Caroline Comby

Promotion 2015-2017

Stage de 2^{ème} année

Date : du 28 avril 2017 au 23 juin 2017

MISE EN PLACE D'UN BIOCAPTEUR A ADN POUR LA DETECTION DE *VIBRIO* PATHOGENES DES HUITRES CREUSES DE LA LAGUNE MEDITERRANEENNE



Secteur d'activité : Environnement ; biotechnologies ; microbiologie ; biologie moléculaire

Lise Barthelmebs

Laboratoire de recherche Biocapteurs-Analyses-Environnement

Université de Perpignan Via Domitia

Bâtiment S

52 Avenue Paul Alduy

66860 PERPIGNAN

France

Mobile : 04.68.66.22.56

Courriel : barthelm@univ-perp.fr



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Elise Da-silva qui m'a encadré et accompagné durant mes dix semaines de stage. Elle m'aura accordé une grande partie de son temps et apporté de nombreux conseils judicieux.

Je remercie Lise Barthelmebs, mon maître de stage, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein du laboratoire BAE et pour son encadrement.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres du BAE, permanents et non permanent, qui auront, de par leur accueil, su créer une ambiance de travail particulièrement agréable.

Enfin, je remercie l'ensemble des stagiaires pour leur ouverture à la communication et les nombreux échanges que nous avons pu avoir.

Liste des sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BAE : Biocapteurs-Analyses-Environnement

DIG : Digoxygénine

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou méthode immuno-enzymatique

HRP : Horseradish Peroxydase

Images : Institut de Modélisation et d'Analyses en GéoEnvironnement

LBBM : Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologies Microbiennes

PC : positive control (contrôle positif)

PCR : Polymerase Chain Reaction

SC : sonde capture

SS : sonde signal

TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

UPVD : Université de Perpignan Via Domitia

VNC : Viables mais Non Cultivables

Glossaire

Biocapteur : Outil analytique composé d'un récepteur biologique lié à un transducteur permettant la reconnaissance spécifique d'une molécule parmi d'autres dans un échantillon.

Biotine : Molécule organique de type coenzyme qui présente une affinité très élevée pour la neutravidine.

Caséine : Molécule organique de type protéine.

Clade : Regroupement d'espèces descendant d'ancêtres communs en phylogénie.

Digoxygénine : Molécule organique de type protéine (stéroïde), fréquemment utilisé comme marqueur de sondes.

Hybridation : Phénomène de biologie moléculaire durant lequel se produit un appariement des bases complémentaires d'acides nucléiques.

Neutravidine : Molécule organique de type protéine, utilisée fréquemment pour son affinité avec la biotine.

Table des matières

Introduction	1
I- Cadre de l'étude.....	3
1. Le laboratoire BAE	3
2. Contexte et objectifs	4
3. Généralités sur les biocapteurs.....	5
II- Matériels et méthodes	6
1. Matériel utilisé	6
2. Méthodes.....	8
2.1. Fonctionnement du biocapteur à ADN au format d'hybridation « piégeage »	8
2.2. Extraction et dosage d'acides nucléiques	12
2.2.1. Extraction d'ADN à l'aide du kit Promega.....	12
2.2.2. Dosage de l'ADN extrait au Picogreen	12
III- Résultats et interprétation.....	13
1. Résultats des courbes de calibration avec les PC.....	13
2. Evaluation de la sensibilité du biocapteur développé	15
2.1. Premiers tests sur ARN	15
2.2. Optimisation des conditions	17
2.3. Test sur ARNs après optimisation des conditions.....	21
3. Evaluation de la spécificité du biocapteur développé	22
3.1. Tests de spécificité en présence de cibles ARN.....	22
3.2. Tests de spécificité en présence de cibles ADN	23
Conclusion	27
Bilan personnel.....	28
Bibliographie.....	29
Annexes.....	I

Table des figures

Figure 1 : schéma représentant le principe de fonctionnement d'un biocapteur	5
Figure 2 : schéma représentant le fonctionnement global du biocapteur à ADN au format d'hybridation "piégeage"	10
Figure 3 : schéma illustré d'un test effectué sur une gamme étalon (contrôle positif)	11
Figure 4 : graphique représentant l'absorbance des PC de <i>V. spp.</i> en fonction de leur concentration	14
Figure 5 : graphique représentant l'absorbance des PC de <i>Vibrio</i> clade Splendidus en fonction de leur concentration	14
Figure 6 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm des ARN de <i>Vibrio</i> clade Splendidus en fonction de sa concentration	16
Figure 7 : a. Graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'un échantillon d'ARN de <i>Vibrio</i> clade Splendidus en fonction de sa concentration (en ng/μL) et b. sa droite régression linéaire	17
Figure 8 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de <i>Vibrio</i> clade Splendidus (à une concentration de 5 ng/μL) en fonction de la réalisation ou non d'une étape de fragmentation de la cible	18
Figure 9 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm du contrôle positif à 0.005 μM (en vert) ou en absence de cible (en rouge) en fonction de la concentration en sonde signal	19
Figure 10 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de <i>Vibrio</i> en fonction du temps d'hybridation	20
Figure 11 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de <i>Vibrio</i> en fonction de sa concentration	21
Figure 12 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de <i>Vibrio</i> (en rouge) et de non <i>Vibrio</i> (en vert) en fonction de leur concentration	23
Figure 13 : droite d'étalonnage représentant la fluorescence du Picogreen obtenue en fonction de la concentration en ADN	24
Figure 14 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ADN de <i>Vibrio</i> (en rouge) et de Non <i>Vibrio</i> (en vert) en fonction de leur concentration	25

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste et description des équipements utilisés	6
Tableau 2 : Séquences d'acides nucléiques synthétiques utilisés	8
Tableau 3 : Absorbances à 630 nm obtenues pour le contrôle positif du clade Splendidus et pour un échantillon d'ARN de <i>Vibrio</i> clade Splendidus	16
Tableau 4 : Absorbances à 630 nm obtenues pour un échantillon d'ARN de a. <i>Vibrio</i> (<i>V. campbellii</i>) et b. non <i>Vibro</i> (<i>Escherichia coli</i>)	22
Tableau 5 : Fluorescence du Picogreen en fonction de la concentration en standard	24
Tableau 6 : Fluorescences obtenues pour un extrait d'ADN d' <i>E. coli</i>	25

Table des annexes

Annexe I : Arbre phylogénétique du genre bactérien <i>Vibrio</i>	I
Annexe II : Composition des tampons utilisés	II
Annexe III : Protocole d'extraction d'ADN bactérien (Kit Promega)	III
Annexe IV : Protocole du dosage d'ADN au Picogreen.....	IV
Annexe V : Protocole du test colorimétrique par l'utilisation du biocapteur à ADN au format d'hybridation "piégeage"	V

Introduction

De nos jours, les zones côtières concentrent de très nombreuses activités, on y retrouve principalement des activités de production (pêche, cultures marines...) ainsi que de loisir (stations balnéaires). Ces zones sont donc soumises à une pression anthropique de grande importance et le milieu aquatique en ces endroits précis subit une grande perturbation.

De plus, le milieu côtier, et plus généralement marin, constitue un habitat pour de nombreux micro-organismes dont la plupart reste encore inconnus. On remarque depuis quelques années dans ces milieux un phénomène que l'on nomme « émergence » ou « réémergence » de pathogènes, notamment des bactéries induisant des maladies chez l'Homme ou chez les organismes aquatiques (exemple des infections hydriques chez l'huître creuse en méditerranée), voire les deux.

Plusieurs études ont montré cette corrélation entre la réémergence de ces micro-organismes et la pression anthropique exercée mondialement sur l'environnement. En effet, la principale cause avancée par les scientifiques est le réchauffement général des mers et océans [1]. Par ailleurs, d'autres paramètres tels que la salinité ou encore la concentration en matière organique ont un impact sur l'abondance et la diversité des *Vibrio* [2], et autres bactéries [1 et 3].

Les maladies bactériennes rencontrées dans les fermes piscicoles ou conchylicoles sont fréquemment associées à la présence d'espèces bactériennes appartenant au genre *Vibrio* [4 et 5] et plus particulièrement au clade^{*1} Splendidus qui contient le plus d'espèces de *Vibrio* pathogènes des poissons et coquillages (notamment des huîtres). Dans ce clade, on retrouve : *V. lentus*, *V. splendidus*, *V. tasmaniensis*, *V. gigantis*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostrea*, *V. pomeroyi*, *V. chagasii*, *V. kanaloae*, *V. pelagius* et *V. fortis* [6].

Il y a approximativement 133 espèces connues dans le genre *Vibrio*, dont de nombreuses sont pathogènes. Cependant, tandis que les pathogènes de l'Homme (par exemple *V. cholerae* ou *V. parahaemolyticus*) sont très bien caractérisés et étudiés [7], les pathogènes des poissons et des coquillages sont quant à eux beaucoup moins sujet à des publications scientifiques [8].

Ce manque d'informations, corrélé à ces pics d'abondance des populations de *Vibrio* sur les côtes, nous conduisent à parler de réémergence des *Vibrio* pour qualifier ce phénomène.

¹ Toutes les annotations * font référence au glossaire présent en début de rapport.

Cette réémergence des *Vibrio* est considérée comme problématique pour :

- La santé publique : du fait de la présence d'espèces pathogènes de l'Homme ;
- L'économie des régions côtières [9] : du fait de la présence des espèces pathogènes en aquaculture.

Nous savons que ce problème se présente sur la plupart des côtes. Une prise de conscience de ce phénomène est en train d'apparaître ; en effet, nombre d'études menées sur l'émergence de pathogènes dans le milieu marin ont été réalisées à la fois en Europe du Nord mais aussi aux USA depuis déjà plusieurs années. En France, quelques-unes de ce type d'études ont été réalisées, mais ces dernières sont encore peu nombreuses par rapport à d'autres pays.

Actuellement, les scientifiques disposent de deux outils principaux pour détecter les bactéries dans l'environnement :

- La culture en milieu classique : cette méthode, peu coûteuse, peut nécessiter jusqu'à une semaine d'incubation avant de permettre la lecture des résultats. A cela s'ajoute le problème des bactéries viables mais non cultivables (VNC), c'est-à-dire que leur culture en boîte de pétri sur les milieux traditionnels est difficile voire impossible, donnant une réponse faussement négative bien qu'elles soient présentes ;
- La PCR, notamment la qPCR (PCR quantitative) : cette méthode est rapide mais les appareils nécessaires à sa réalisation sont très coûteux.

On remarque que ces analyses ne peuvent être effectuée *in situ* et rarement en temps réel. C'est pourquoi, afin d'éviter ces problèmes majeurs, de nouveaux outils d'analyses ont été développés : les biocapteurs*. L'utilisation de biocapteurs dans ce genre d'analyses engendre un coût faible comparativement aux méthodes nécessitant des appareillages plus complexes.

Durant mon stage je suis intervenue sur la mise en place d'un biocapteur à ADN au format d'hybridation de type « piègeage ». L'objectif étant de pouvoir analyser des échantillons d'eau de lagunes prélevés sur le terrain afin de déterminer la présence ou l'absence de *Vibrio* et de les quantifier dans le premier cas.

La conception d'un biocapteur à ADN permettra-t-elle de détecter spécifiquement la présence des *Vibrio* pathogènes des huîtres et autres coquillages dans des échantillons d'eau de mer ?

Dans ce rapport, est tout d'abord présenté le cadre global de l'étude, c'est-à-dire le laboratoire de recherche Biocapteurs-Analyses-Environnement (BAE), le contexte dans lequel s'inscrit mon stage et la description générale des biocapteurs. Par la suite, nous suivrons la démarche mise en place pour développer ce type de biocapteurs, détaillant la méthode et les équipements employés. Enfin, la dernière partie de ce rapport est consacrée aux résultats obtenus ainsi qu'à leurs interprétations.

I- Cadre de l'étude

1. Le laboratoire BAE

Le laboratoire Biocapteurs-Analyses-Environnement (BAE) a été créé en 2007 au sein du campus de l'Université de Perpignan. Initialement nommé Institut de Modélisation et d'Analyses en GéoEnvironnement (IMAgES) ce laboratoire orientait ses recherches vers les modifications environnementales issues de perturbations aussi bien anthropiques que naturelles.

Aujourd'hui, l'équipe de recherche du BAE, regroupe principalement des enseignant-chercheurs, post-doctorants et doctorants en chimie et biologie. Cette équipe pluridisciplinaire mène des études spécialement axées sur l'agroalimentaire et l'environnement par le développement d'outils d'analyse innovants de type biocapteurs. L'objectif premier des études réalisées par le laboratoire est de répondre aux exigences des normes européennes et françaises mises en place pour la surveillance des différents compartiments environnementaux et matrices alimentaires.

Plusieurs programmes de recherche sont en cours au sein du BAE. Certains portent sur la conception de biocapteurs et leur utilisation pour des analyses. D'autres sur l'étude de la fluorescence des substances naturelles dans l'environnement...

Récemment, le BAE et le Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM) de Banyuls-sur-Mer sont entrés en partenariat sous la forme « d'équipe – projet » afin d'être complémentaires dans la réalisation d'études communes. Ces études sont dirigées vers l'évaluation de la qualité des milieux essentiellement aquatiques et le développement d'outils techniques nécessaires à ces analyses.

2. Contexte et objectifs

Le développement des biocapteurs, notamment pour la détection et la quantification de micro-organismes est en plein essor. En effet, ces nouvelles techniques d'analyses, de plus en plus performantes, permettent une analyse rapide des échantillons et ont l'avantage de pouvoir s'effectuer sur le terrain [10].

Mon stage s'inscrit dans le cadre de la thèse d'Elise Da-Silva intitulée : « Monitoring des populations de *Vibrio* impliquées dans les mortalités des huîtres creuses en lagune méditerranéenne » et effectuée au Laboratoire Biocapteurs-Analyses-Environnement de Perpignan. Cette thèse a pour but de développer des biocapteurs à ADN pour le suivi et la quantification, dans l'eau de mer, de populations de *Vibrio* ciblées : celles impliquées dans la mortalité des huîtres creuses en lagune méditerranéenne. Parmi les biocapteurs à ADN mis en place, on distingue deux formats :

- Un format d'hybridation « sandwich » ;
- Un format d'hybridation « piégeage ».

Le but de cette étude étant de mettre au point et de valider une méthode de détection des micro-organismes selon deux niveaux que nous distinguons de la manière suivante :

- Le genre *Vibrio* dans son ensemble ;
- Le clade Splendidus comprenant de nombreuses espèces de *Vibrio* pathogènes pour les coquillages (voir Annexe I).

La détection mise au point cible spécifiquement les acides nucléiques (ADN ou ARN 16 S) de ces micro-organismes suivant ce que l'on souhaite étudier, c'est-à-dire le genre *Vibrio* dans son ensemble, ou bien uniquement le clade Splendidus.

Dans cette étude, nous avons utilisé le type de biocapteur suivant :

- Bio-récepteur : les sondes ADN ;
- Transducteur : optique avec détection par colorimétrie (mesure de l'absorbance).

Ce choix de biocapteur s'explique par la nature de l'analyte recherché (ici les acides nucléiques cibles) ainsi que par la méthode de détection préférentielle (ici colorimétrie).

En effet, le génome de tous les micro-organismes est constitué de séquences nucléotidiques contenant des portions relativement uniques et ces séquences spécifiques peuvent être ciblées par des sondes constituées d'ADN [11].

Aujourd'hui nous savons que ces sondes sont utilisées avec succès pour l'identification d'un grand nombre de pathogènes par la simple analyse d'échantillons contenant les ADN ou ARN spécifiques des organismes recherchés [12].

Les sondes qui ont été utilisées dans cette étude sont deux sondes ADN simple brins. L'utilisation des sondes ADN monocaténares plutôt que des ADN doubles brins permet d'éviter une étape supplémentaire : la dénaturation de l'ADN bicaténaire. De plus, les molécules ciblées sont des ARN car, malgré une fragilité supérieure à celle de l'ADN, les molécules d'ARN sont naturellement simples brins, ce qui permet une hybridation directe de la cible sur la sonde ADN.

3. Généralités sur les biocapteurs

Les biocapteurs sont des outils d'analyses constitués de deux parties :

- Le récepteur biologique (ou bio-récepteur) : permet la détection spécifique d'une molécule ;
- Le transducteur physico-chimique : permet la conversion du signal biologique en un signal numérique.

Les bio-récepteurs utilisés sont divers (exemple : enzymes, anticorps, ADN, cellules entières...), de même, il existe différents types de transducteurs (exemple : électrochimique, optique, piézoélectrique...) [13]. Lorsque le biocapteur est utilisé pour l'analyse de micro-organismes, les deux principaux types de bio-récepteurs utilisés sont les anticorps et les ADN.

Ce système peut être synthétisé de la manière suivante (Figure 1) :

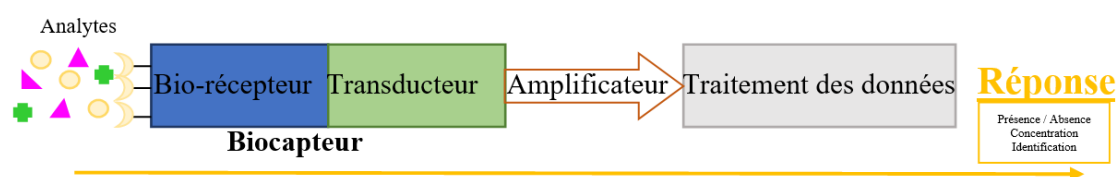


Figure 1 : schéma représentant le principe de fonctionnement d'un biocapteur

C'est donc dans l'optique de pouvoir détecter spécifiquement les espèces susmentionnées que nous mettons au point notre biocapteur à ADN.

II- Matériels et méthodes

Dans cette partie je vais décrire le matériel et les protocoles utilisés pour la réalisation des manipulations effectuées pendant ces dix semaines de stage.

1. Matériel utilisé

Tableau 1 : Liste et description des équipements utilisés

Incubateur double plaque (Ref. INCU-MIXER MP Benchmark) Permet d'incuber des microplaques à température optimale et de les agiter.	
Agitateur de microplaques Permet l'agitation à température ambiante des plaques à durée et vitesse variable.	
Incubateur support Plaque/Tubes eppendorf (1.5 ml) (Ref. Thermomixer comfort eppendorf) Il permet à la fois de chauffer et d'agiter des solutions contenues aussi bien dans des tubes eppendorfs que dans des microplaques.	
Pipettes automatiques avec leurs cônes à filtre correspondant (de gauche à droite : Pipetman ACURA 825 100-1000 μL ; Pipetman 0.2-20 μL ; Pipetman 2-20 μL) Elles permettent de pipetter des volumes très précis. Leurs cônes à filtres permettent d'éviter la contamination des échantillons	

Congélateur -80°C Permet le stockage et la conservation des échantillons d'ARN utilisés lors du test colorimétrique.	
Thermocycleur (Ref. Mastercycler personal eppendorf) Il est utilisé lors des étapes de chauffage, par exemple lors de la réalisation de PCR ; ou pour dénaturer des molécules par chauffage.	
Lecteur de microplaque UV-visible (Thermo Multiskan EX) Utilisé pour la mesure de l'absorbance.	
Balance de précision Utilisée pour la pesée de petites quantités.	
Agitateur magnétique Permet d'agiter afin de dissoudre des poudres en solution notamment lors de la préparation des solutions tampon.	

A l'appareillage s'ajoute les solutions tampons utilisées, que l'on peut catégoriser de la manière suivante :

- Les tampons de lavage : Hybridation 1X, POP 1X, PBS 1X ;
- Les tampons de solubilisation et de conservation : BB 1X, PBS-T-BSA ;
- Les tampons favorisant l'hybridation : Hybridation 4X, BeadBuffer.

La composition de ces tampons est listée en Annexe II.

2. Méthodes

2.1. Fonctionnement du biocapteur à ADN au format d'hybridation « piègeage »

Le Tableau 2 ci-dessous indique les séquences des sondes ADN synthétisées par l'entreprise Microsynth, validées par Elise Da-Silva [14] et utilisées lors des tests :

Tableau 2 : Séquences d'acides nucléiques synthétiques utilisés

Identification	Nature	Séquence (5' vers 3')	Nombre de nucléotides (pb)	Modification (3')
<i>Vibrio</i> spp. 16S	Sonde Capture	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT	35	Biotine
	Contrôle Positif	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT	35	Aucune
	Sonde Signal	ACCTGCATGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTA	35	Digoxygénine
Clade Splendidus16S	Sonde Capture	CCTCGGAAGTGCATTGAAACTGGTGAAGTAGAGT	35	Biotine
	Contrôle Positif	CCTCGGAAGTGCATTGAAACTGGTGAAGTAGAGT	35	Aucune
	Sonde Signal	ACTCTAGTTCACCAGTTCAAATGCAGTTCGAGG	35	Digoxygénine

Parmi ces sondes on distingue :

- La Sonde Capture (SC) : courte séquence d'ADN dont l'enchaînement des nucléotides est identique à la séquence que l'on souhaite cibler. Cette sonde est modifiée en son extrémité 3' par l'ajout d'une biotine* ;
- Le Contrôle Positif (aussi appelé Positive Control en anglais, ou PC) : sa séquence est identique à la SC, elle joue le rôle de cible c'est la raison pour laquelle elle ne présente pas de modification ;
- La Sonde Signal (SS) : courte séquence d'ADN dont l'enchaînement des nucléotides est complémentaire à la séquence que l'on souhaite cibler ainsi qu'à la SC. Cette sonde est modifiée en son extrémité 3' par l'ajout d'une digoxygénine* (DIG).

A l'issue de la mise en commun de ces éléments on retrouve deux configurations possibles :

- En absence de PC, la SS s'hybride à la SC : le signal colorimétrique est maximal ;
- En présence de PC, la SS s'hybride au PC : le signal colorimétrique diminue avec l'augmentation de la concentration en PC.

Le support de notre biocapteur est une plaque 96 puits habituellement utilisée en immunologie. Dans un premier temps, nous tapissons le fond de chaque puits par une solution contenant une protéine spécifique : la Neutravidine*.

Après la fixation de cette protéine, nous avons rajouté une solution contenant les sondes ADN appelées sondes « captures ». Ces sondes « capture » sont marquées par des molécules de biotine qui interagissent avec la neutravidine par des liaisons faibles et peuvent donc s'y fixer. En effet, l'affinité biotine/neutravidine est très forte.

De façon à éviter toute fixation non spécifique sur la neutravidine, c'est-à-dire toute interaction autre que Biotine/Neutravidine, nous avons rajouté dans chaque puits une solution de caséine* afin de bloquer les sites non spécifiques.

Par la suite, nous réalisons une étape d'hybridation* entre notre cible (qui peut être un échantillon d'acide nucléique de *Vibrio* spp. ou de *Vibrio* clade Splendidus ou encore un contrôle positif) et les sondes « signal », qui sont complémentaires de la séquence de la cible recherchée.

Ce mélange est ensuite ajouté dans les puits de la microplaque et une nouvelle réaction se produit : les sondes « signal » qui n'auront pas formé de complexe avec les cibles vont interagir avec les sondes « capture ». En effet, les sondes « signal » et « capture » sont complémentaires l'une de l'autre, (cependant leur force de liaison est insuffisante pour dissocier le complexe sonde signal/cible lorsqu'il a lieu). Ainsi, seules les sondes « signal » qui n'auront pas été hybridées aux cibles pourront être fixées aux sondes « capture » présentes dans les puits de la microplaque.

Suite à cette étape, on ajoute une solution de conjugué Anticorps (Anti-DIG) / Enzyme (HRP : Horseradish Peroxidase). L'anticorps étant dirigé contre la molécule DIG, il va pouvoir se fixer au marqueur (DIG) de la sonde « signal ».

Dans un dernier temps, on ajoute une solution de TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine), qui est initialement incolore. Cependant, ce TMB est un substrat qui, en présence de l'enzyme HRP fixée à l'anticorps, est oxydé et forme un produit d'une coloration bleutée ($\lambda_{\max}=630 \text{ nm}$).

Notons qu'entre chacune de ces étapes, nous avons réalisé des lavages successifs avec différents tampons dans chaque puits afin d'éliminer les éléments qui ne se sont pas fixés.

Toutes ces étapes sont représentées par le schéma ci-dessous (Figure 2) :

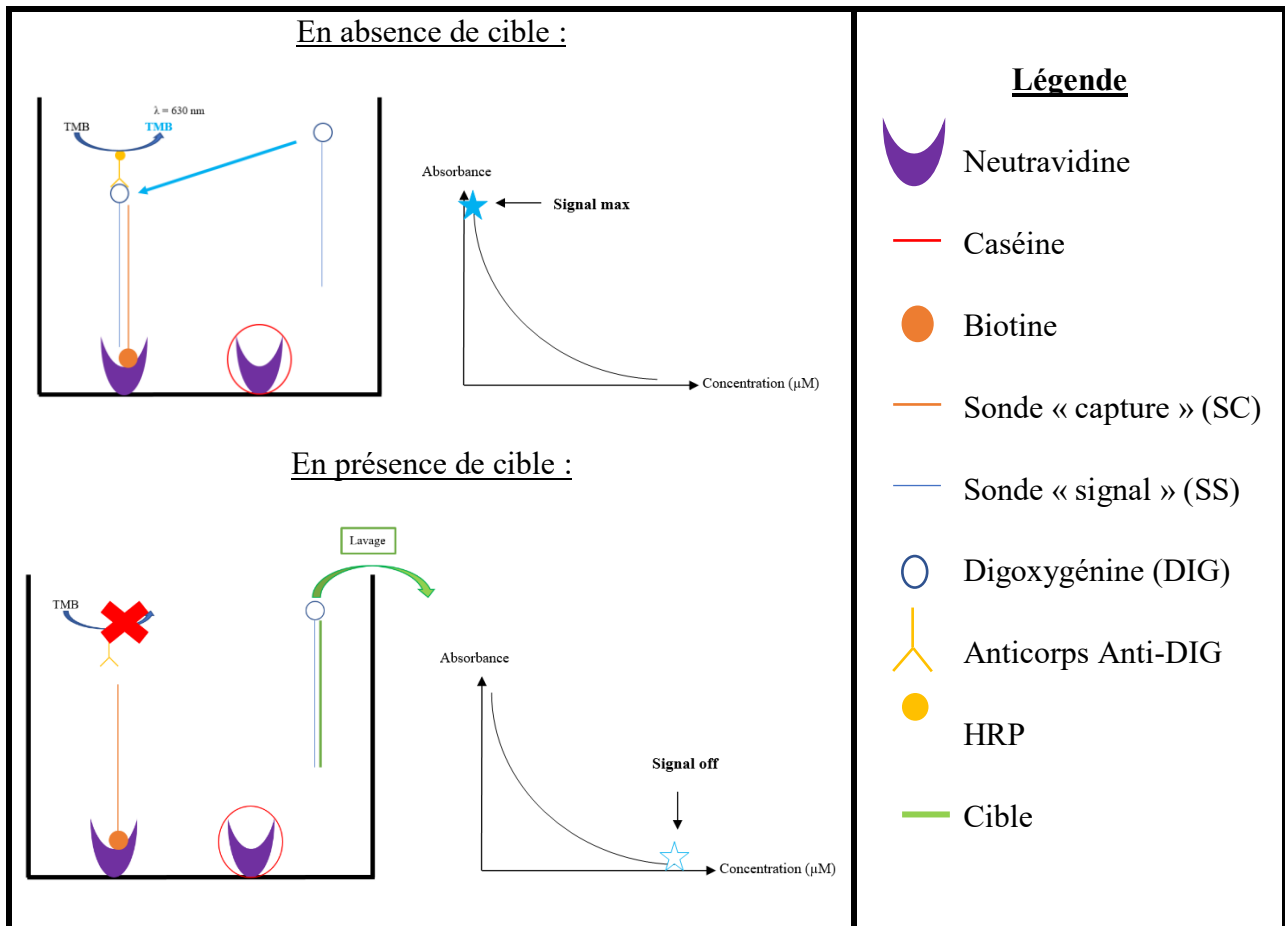


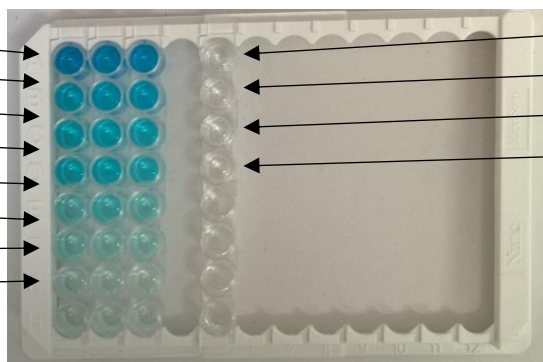
Figure 2 : schéma représentant le fonctionnement global du biocapteur à ADN au format d'hybridation "piégeage"

Notons que pour plus de précision, nous avons réalisé nos mesures en triplicats.

On remarque que notre signal, qui se traduit ici par une coloration bleue de la solution dans le puits, est inversement proportionnel à la quantité de cible présente dans l'échantillon (Figure 3). En effet, plus la coloration sera importante, plus il y aura de sonde « signal » associée à la sonde « capture » car il y aura eu peu d'hybridation entre la sonde « signal » et la cible.

Concentrations PC dans le mix (μM)

0
0,0001
0,0005
0,001
0,005
0,01
0,05
0,1



Témoins

Neutravidine/SC/caséine/Anti-DIG/TMB
Neutravidine/Anti-DIG/TMB
Neutravidine/caséine/Anti-DIG/TMB
Neutravidine/SS/caséine/Anti-DIG/TMB

Figure 3 : schéma illustré d'un test effectué sur une gamme étalon (contrôle positif)

Sachant que les concentrations en sondes sont fixes ($[\text{SC}] = 0.1 \mu\text{M}$; $[\text{SS}] = 0.001 \mu\text{M}$), ceci indique que les variations de densité optique (Figure 3) sont uniquement dues aux variations de concentration en cible (à 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001 et 0 μM).

Afin de s'assurer que la réponse ne provienne pas d'une interaction non spécifique entre les différents réactifs utilisés au cours du test et qu'elle soit uniquement liée à l'hybridation de la sonde signal avec la sonde capture en absence de cible j'ai réalisé, lors de chaque test, quatre témoins dits « négatifs ». Dans ces puits nous ajoutons un seul des éléments utilisés afin de vérifier si leur présence seule interfère avec l'ajout du conjugué Anti-corps/Enzyme et du TMB ; les compositions sont les suivantes :

- Neutravidine, Anti-DIG/HRP, TMB : permet de vérifier que la réponse n'est pas due à l'interaction Anticorps / neutravidine ;
- Neutravidine, caséine, Anti-DIG/HRP, TMB : permet de vérifier que la réponse n'est pas due à l'interaction Anticorps / caséine ;
- Neutravidine, caséine, Sonde Capture, Anti-DIG/HRP, TMB : permet de vérifier que la réponse n'est pas due à l'interaction Anticorps / sonde capture ;
- Neutravidine, caséine, Sonde Signal, Anti-DIG/HRP, TMB : permet de vérifier que toute sonde signal non fixée à une sonde capture est éliminée lors des lavages successifs.

Le protocole étant défini (Annexe V), c'est suivant ce dernier que les premières manipulations ont commencées. Notons qu'avant le début de mon stage, les conditions opératoires (c'est-à-dire les concentrations en SC et SS ainsi que les temps d'incubation) concernant le format d'hybridation piégeage ont été optimisées.

Les tests réalisés sur les acides nucléiques ont été effectués à partir de différentes souches bactériennes, dont les échantillons ont été extraits et dosés avant mon arrivée.

2.2. Extraction et dosage d'acides nucléiques

Les tests sur échantillons réels ont été réalisés sur des acides nucléiques de type ARN (ciblant ARN 16S) déjà extraits et dosés avant mon arrivée et de type ADN.

2.2.1. Extraction d'ADN à l'aide du kit Promega

L'extraction d'ADN de bactéries à l'aide du kit Promega est détaillée en Annexe III. Cependant, les points essentiels sont les suivants :

- Lyse des cellules : cette étape associe agent destructurant (« Nuclei Lysis Solution ») et chauffage (80°C durant 5 minutes) afin d'éclater les membranes cellulaires des bactéries et d'exposer les cibles (brins d'ADN) et autres molécules (ARN, protéines). L'ajout d'une solution de RNase dans cette étape permet d'éliminer les brins d'ARN. A ce stade, la centrifugation permet d'éliminer la quasi-totalité des éléments indésirables par la formation d'un culot. Seuls l'ADN et les protéines sont encore en suspension dans le surnageant ;
- Précipitation des protéines : afin de purifier le surnageant, on ajoute la « Protein Precipitation Solution », qui, associée à l'incubation à 4°C et à la centrifugation, permettent de séparer les protéines de l'ADN encore en suspension dans le surnageant par la formation d'un culot.
- Précipitation et réhydratation : dans un premier temps, l'ajout d'isopropanol permet la précipitation de l'ADN en filaments très fins qui sont séparés du surnageant par centrifugation. Suite à l'élimination du surnageant, on conserve le culot d'ADN que l'on purifie par l'ajout d'éthanol 70% puis on le réhydrate par l'ajout de « DNA Rehydration Solution ».

2.2.2. Dosage de l'ADN extrait au Picogreen

Le dosage de l'ADN extrait est réalisé en deux temps, le protocole détaillé se situe en Annexe IV. En effet, le réactif principal étant le Picogreen, qui est un intercalant de l'ADN, c'est une molécule qui fluoresce : longueur d'onde d'excitation = 485 nm et longueur d'onde d'émission = 538 nm. Ainsi, on peut établir une relation stable entre absorbance de l'échantillon et

concentration en cible (ADN extrait ou solution standard). Cette relation étant régit par la loi de Beer-Lambert :

$$A = l \times \epsilon \times C$$

Avec « A » l'absorbance mesurée, « l » la longueur du puits, « ϵ » le coefficient d'extinction molaire, et « C » la concentration en cible.

Tout d'abord, on réalise une gamme étalon à partir d'une solution standard afin d'obtenir cette relation mathématique entre absorption et concentration en ADN. Pour cela on effectue 6 points de mesure aux concentrations suivantes (en ng/μL) : 1 ; 0.5 ; 0.1 ; 0.05 ; 0.005 ; 0. On obtient une droite d'étalonnage en appliquant une régression linéaire sur la courbe obtenue, dont l'équation est du type $y = ax + b$, avec « y » l'absorbance mesurée et « x » la concentration en ADN.

Une fois la courbe d'étalonnage établie, la mesure de l'absorbance des échantillons d'ADN extraits en présence de Picogreen permet d'obtenir la concentration en ADN. Pour cela, il suffit de remplacer dans l'équation de droite la valeur de l'absorbance mesurée.

III- Résultats et interprétation

1. Résultats des courbes de calibration avec les PC

Dans un premier temps, j'ai établi des courbes de calibration donnant une relation fixée entre les concentrations connues en cible et le signal colorimétrique résultant. J'ai donc pu établir deux courbes de calibration, obtenues à partir du piégeage de ces « contrôles positifs » en utilisant :

- Soit le contrôle positif pour le genre *Vibrio* spp. (Tableau 2) ;
- Soit le contrôle positif pour le clade Splendidus parmi le genre *Vibrio* (Tableau 2).

Les tests effectués dans cette partie ont été réalisés en triplicats, les figures présentées sont donc issues des moyennes de ces résultats.

On observe la réponse du dispositif lorsque différentes concentrations en cible sont mises au contact des sondes « signal » et « capture » (Figure 4 et Figure 5).

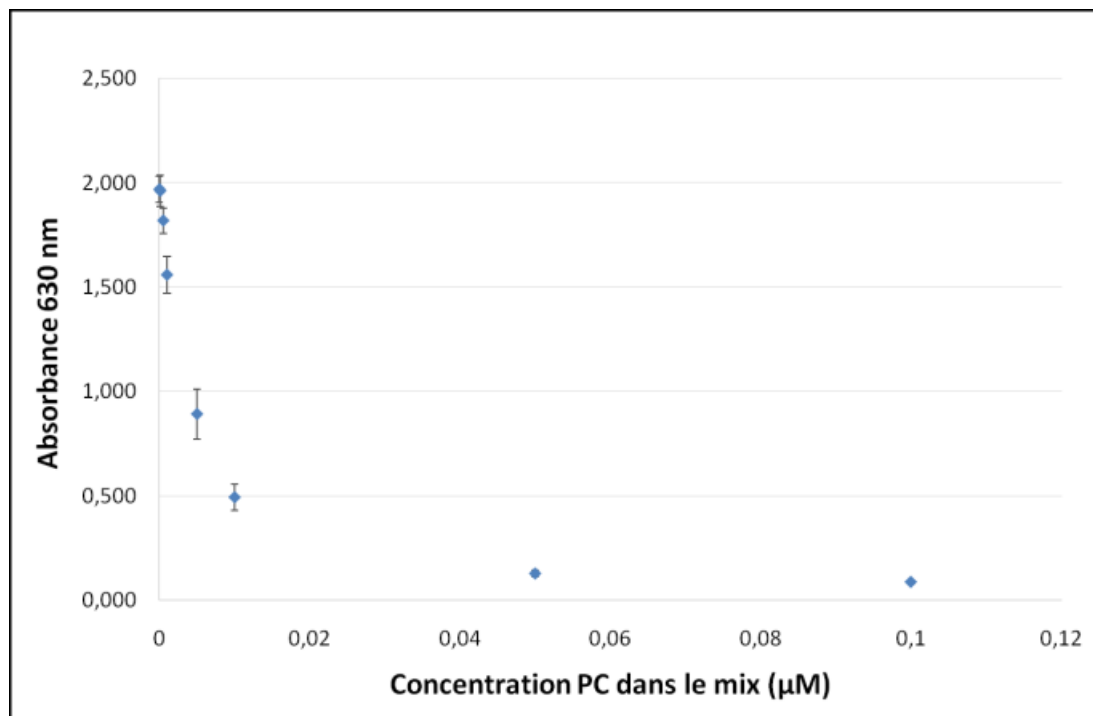


Figure 4 : graphique représentant l'absorbance des PC de *V. spp.* en fonction de leur concentration

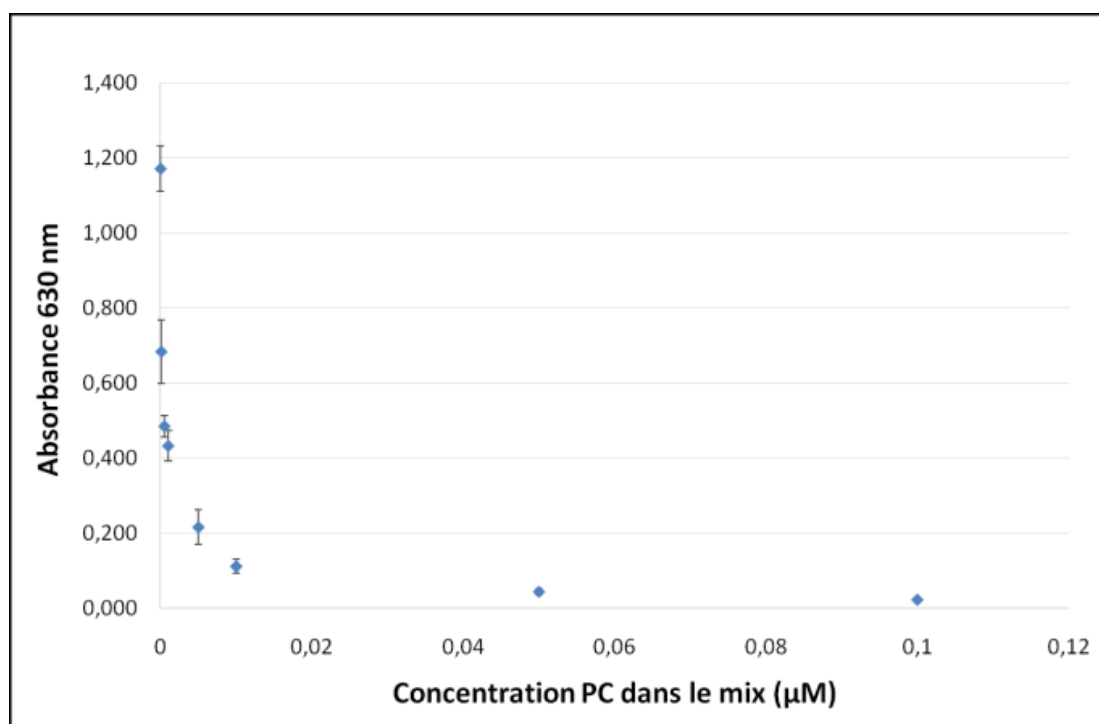


Figure 5 : graphique représentant l'absorbance des PC de *Vibrio* clade Splendidus en fonction de leur concentration

Les deux tests colorimétriques donnent une réponse similaire pour le genre *Vibrio* ainsi que pour le clade Splendidus. On observe une décroissance de l'absorbance avec l'augmentation de la concentration en cible. Cette diminution du signal est très rapide dans les plus faibles concentrations jusqu'à la concentration 0.005 μM , pour les deux conditions opératoires (Figure 4 et Figure 5). D'autre part, au-dessus de cette concentration, on remarque l'apparition d'un plateau : le signal obtenu atteint sa valeur minimale.

Afin de pouvoir établir une relation entre la concentration en cible et l'absorbance résultante, des mesures réalisées à partir d'échantillons d'ARN ou d'ADN extraits de souches bactériennes pures ont été effectuées. Pour cela, nous avons aussi réalisé deux témoins positifs afin que les tests sur ARN/ADN puissent être interprétés. Nous avons donc choisi de répéter deux des points de mesures effectués lors de la calibration du biocapteur :

- Le premier correspond au signal maximum : aucune cible n'est mise en présence de la sonde signal ;
- Le second correspond au signal obtenu par l'ajout du contrôle positif à une concentration de 0.005 μM . Le choix de ce dernier nous permet d'avoir une réponse suffisamment éloignée du signal maximum sans que le signal résultant soit éteint.

2. Evaluation de la sensibilité du biocapteur développé

2.1. Premiers tests sur ARN

Une fois les courbes de calibration obtenues, j'ai réalisé des tests avec des échantillons réels d'ARN issus de différentes souches de *Vibrio*.

Les premiers essais effectués ont été réalisés sur des échantillons d'ARN de *Vibrio* clade Splendidus sur une gamme de concentration allant de 0,1 ng/ μL à 5 ng/ μL (Tableau 3).

Tableau 3 : Absorbances à 630 nm obtenues pour le contrôle positif du clade Splendidus et pour un échantillon d'ARN de *Vibrio* clade Splendidus

Cible : PC <i>Vibrio</i> clade Splendidus		
Concentration en cible (µM)	Absorbance moyenne corrigée	Ecart-type
0	1,193	0,038
0,005	0,398	0,018
Cible : ARN <i>Vibrio</i> clade Splendidus		
Concentration en cible (µM)	Absorbance moyenne corrigée	Ecart-type
0,1	1,215	0,049
0,5	1,102	0,146
1	1,147	0,066
2,5	1,050	0,123
5	1,209	0,088

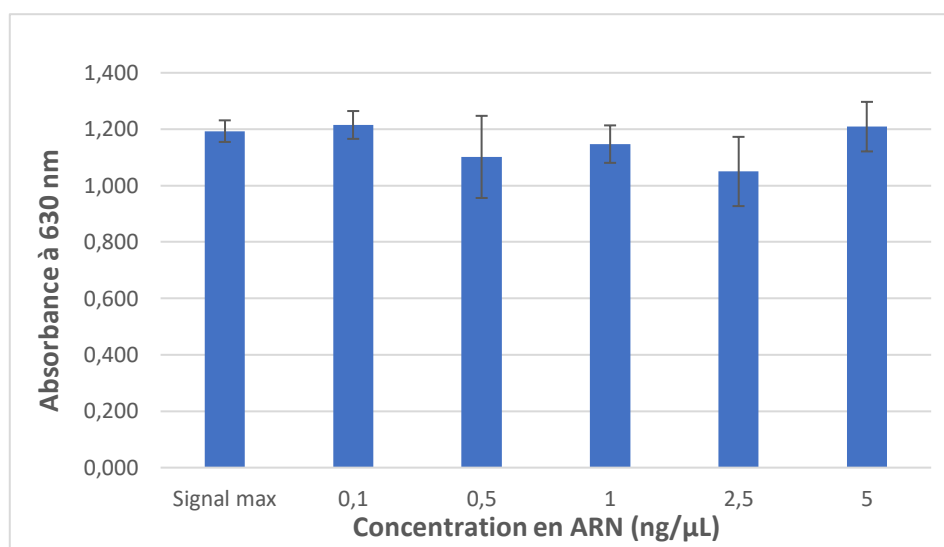


Figure 6 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm des ARN de *Vibrio* clade Splendidus en fonction de sa concentration

Dès le début de cette manipulation, j'ai rencontré le problème suivant : la gamme de concentration en ARN étant de [0,1 ; 5] ng/µL, les résultats n'ont pas montré de différence significative dans la mesure des absorbances pour chaque concentration (Figure 6).

Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons émis l'hypothèse que les concentrations en ARN sont trop faibles pour le fonctionnement de ce format. C'est pourquoi j'ai effectué un test sur trois points de concentration plus élevées.

Les résultats obtenus sont les suivants :

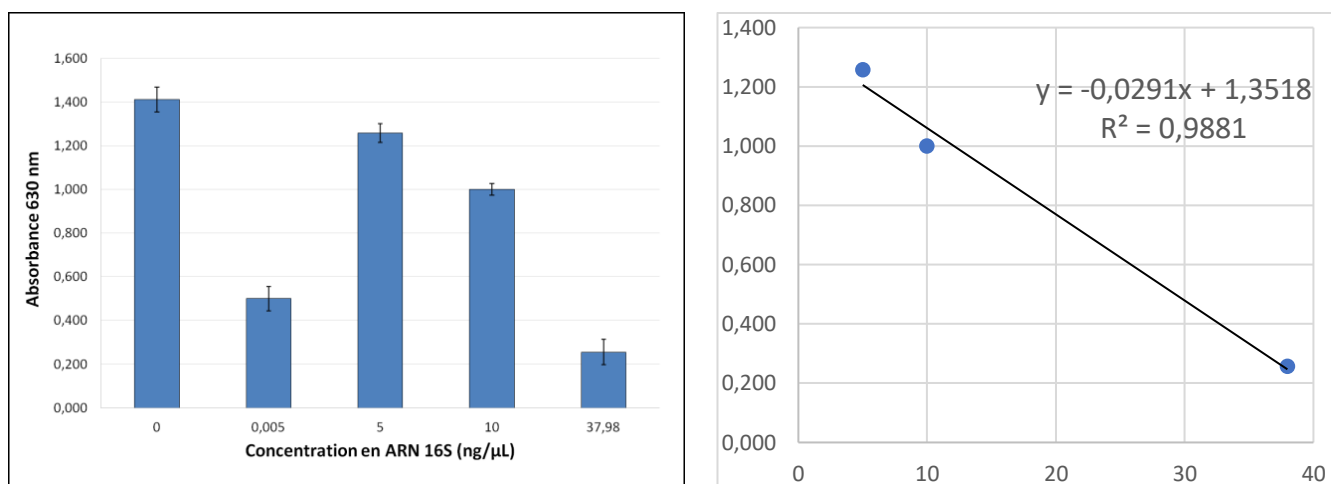


Figure 7 : a. Graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'un échantillon d'ARN de *Vibrio* clade Splendidus en fonction de sa concentration (en ng/μL) et b. sa droite régression linéaire

Le signal obtenu est effectivement atténué (Figure 7 a.) lorsque la concentration en ARN cible est élevée. La figure (Figure 7 b.) met en évidence la relation linéaire entre la quantité en ARN sur la plage de concentration indiquée et le signal colorimétrique résultant. En effet, le coefficient R^2 étant proche de 1 ($R^2 = 0.9881$) nous pouvons en déduire que l'équation de régression permet d'obtenir une bonne estimation de la concentration en ARN de *Vibrio*.

Nous aurions souhaité utiliser cette droite en tant que référence pour la quantification de l'espèce correspondante (ici *Vibrio pomeroyi*) cependant le nombre de points de mesures, soit 3, est insuffisant.

Notons toutefois que le fait d'augmenter la plage de concentration réduit significativement la sensibilité de notre biocapteur. C'est pourquoi j'ai tenté d'optimiser les conditions opératoires en présence d'ARN.

2.2. Optimisation des conditions

Test 1 : fragmentation de l'ARN cible

Dans un premier temps, j'ai vérifié l'impact de la fragmentation de l'ARN cible sur la réponse obtenue. Nous supposons que le fait de fragmenter notre ARN cible permettait une meilleure

hybridation entre les sondes signal et les séquences cibles des ARNs. En effet, la molécule d'ARN est susceptible d'adopter une conformation particulière et de se replier sur elle-même, empêchant ainsi l'accès à la séquence d'ARN 16S ciblée par la sonde signal. Le fait de fragmenter cette molécule réduirait donc sa taille et ses possibilités de repli en structure de type « tige-boucle ».

Cependant, les résultats obtenus ont montré le phénomène inverse :

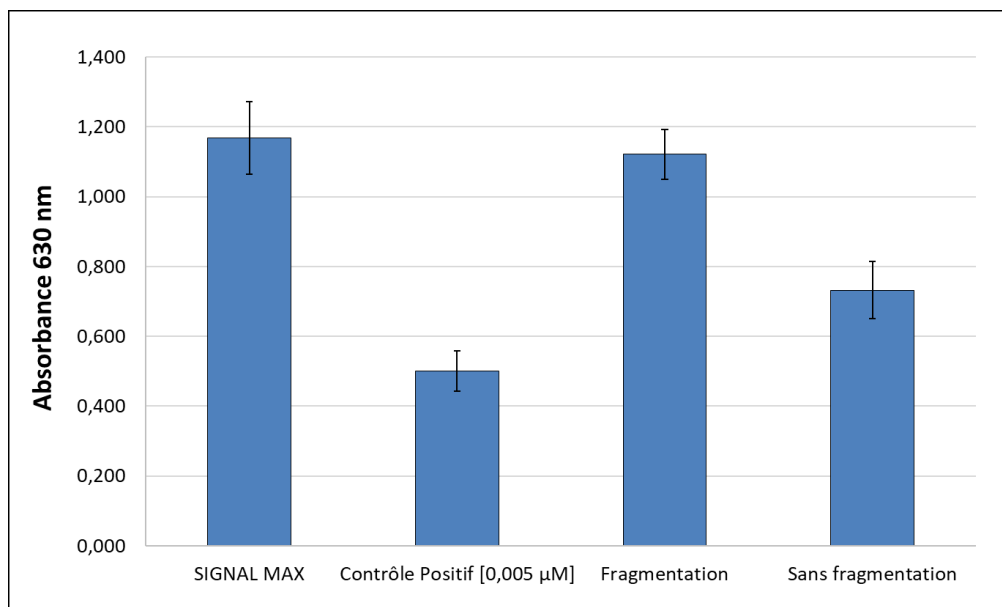


Figure 8 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de *Vibrio* clade Splendidus (à une concentration de 5 ng/µL) en fonction de la réalisation ou non d'une étape de fragmentation de la cible

Le signal résultant lorsque l'ARN n'est pas fragmenté est plus faible que lorsque l'on conserve l'étape de fragmentation (Figure 8). Ceci est probablement dû au fait que la fragmentation, aléatoire, est susceptible de cliver la séquence cible. Sachant que l'on cherche à obtenir les extinctions de signal les plus importantes, tous les tests sur acides nucléiques ou PC que j'ai effectué par la suite ont été réalisés sans l'étape de fragmentation, seulement en chauffant la cible en présence de la sonde signal à 92°C durant trois minutes, suivit de l'étape d'hybridation.

Notons toutefois que la diminution du signal obtenue lors de ce test reste malgré tout insuffisante, j'ai donc continué à tenter d'optimiser les autres conditions.

Test 2 : concentration en sonde Signal

Dans un second temps, j'ai cherché à optimiser la concentration en sonde signal. En effet, nous sommes partis du postulat suivant : si, à concentration en sonde signal fixée, on obtient une réduction du signal en augmentant fortement la concentration en cible ; alors, fixer la concentration en sonde signal à une valeur plus faible permettrait d'obtenir une réponse de notre biocapteur pour des concentrations en cibles inférieures à 100 ng/ μ L d'échantillon. De cette manière, on retrouverait une meilleure sensibilité du biocapteur.

Ainsi, j'ai réalisé des tests comparatifs, en utilisant les contrôles positifs (PC) de *Vibrio* spp., et en faisant varier la concentration en sonde signal de la manière suivante :

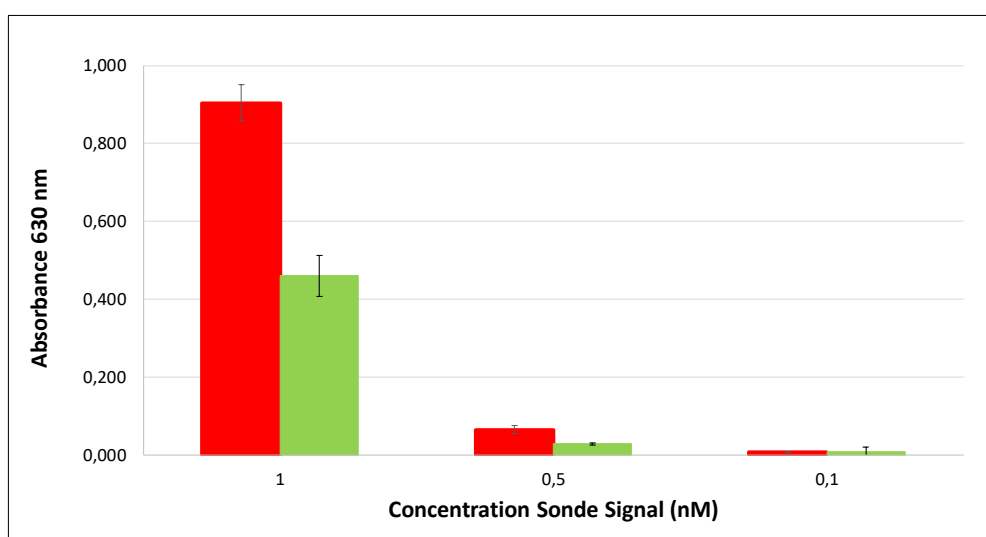


Figure 9 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm du contrôle positif à 0.005 μ M (en vert) ou en absence de cible (en rouge) en fonction de la concentration en sonde signal

On remarque sur la Figure 9 que pour les concentrations en sonde signal fixées à 0,5 nM et 0,1 nM, le signal est quasiment, voire totalement, éteint. On ne peut donc pas utiliser ces concentrations lors des tests sur échantillons d'ARN. Seule la concentration en SS à 1 nM donne une réponse dont le signal est suffisamment important pour permettre une réduction du signal de plus de 50 % voire une extinction lors d'un test avec des échantillons réels de *Vibrio*.

Suite à ce test, on peut conclure que la concentration optimale en sonde signal est de 1 nM, ce qui correspond à la concentration qui était précédemment utilisée.

Test 3 : durée de l'hybridation

Sachant qu'il m'était impossible de réduire la concentration en sonde signal, nous avons cherché une autre approche qui nous aurait permis d'augmenter la sensibilité de ce biocapteur.

Par le test suivant (Figure 10), j'ai pu vérifier l'incidence de la durée affectée à l'étape d'hybridation. L'hypothèse de départ était la suivante : si l'on réduit le temps d'hybridation entre la sonde signal (libre) et la sonde capture, alors la réponse colorée doit être de plus faible importance.

Les résultats obtenus sont les suivants :

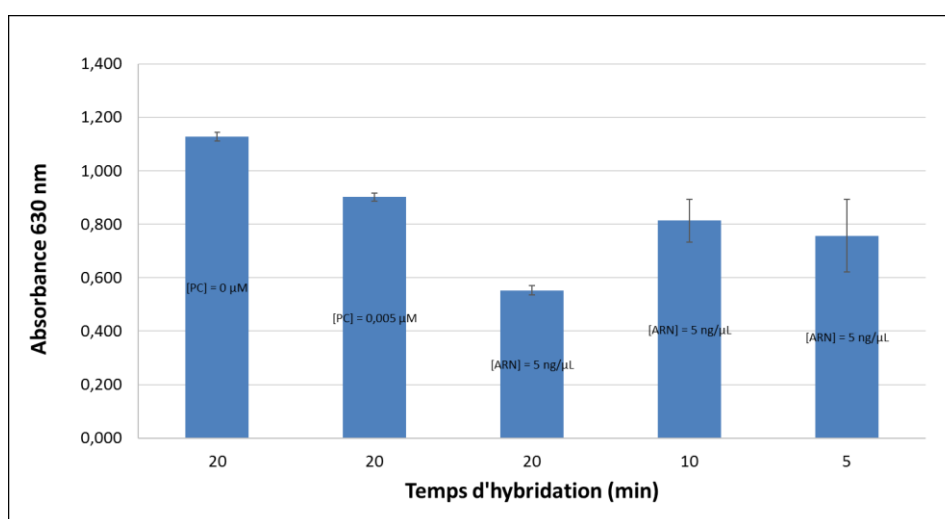


Figure 10 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de *Vibrio* en fonction du temps d'hybridation

On observe que, non seulement le signal est plus élevé pour des durées d'hybridation réduites (soit 10 minutes et 5 minutes), mais en plus, les valeurs de nos écarts types augmentent fortement. Seule la durée fixée à 20 minutes donne un signal faible par rapport au signal maximum (extinction de 50% environ). De plus, les barres d'erreurs sur la mesure à 20 minutes ne recoupent pas celles des autres mesures, ce qui nous permet d'affirmer que le pourcentage d'extinction sur cette condition est significativement différent de celui des deux autres temps d'hybridation.

Ainsi, j'en ai conclu que pour ce biocapteur, la durée d'hybridation optimale est de 20 minutes.

2.3. Test sur ARNs après optimisation des conditions

Une fois les conditions opératoires optimisées, j'ai effectué une nouvelle mesure d'absorbance sur une gamme d'ARN de *Vibrio* allant de 0,625 ng/μL à 10 ng/μL. J'ai obtenu les résultats suivants :

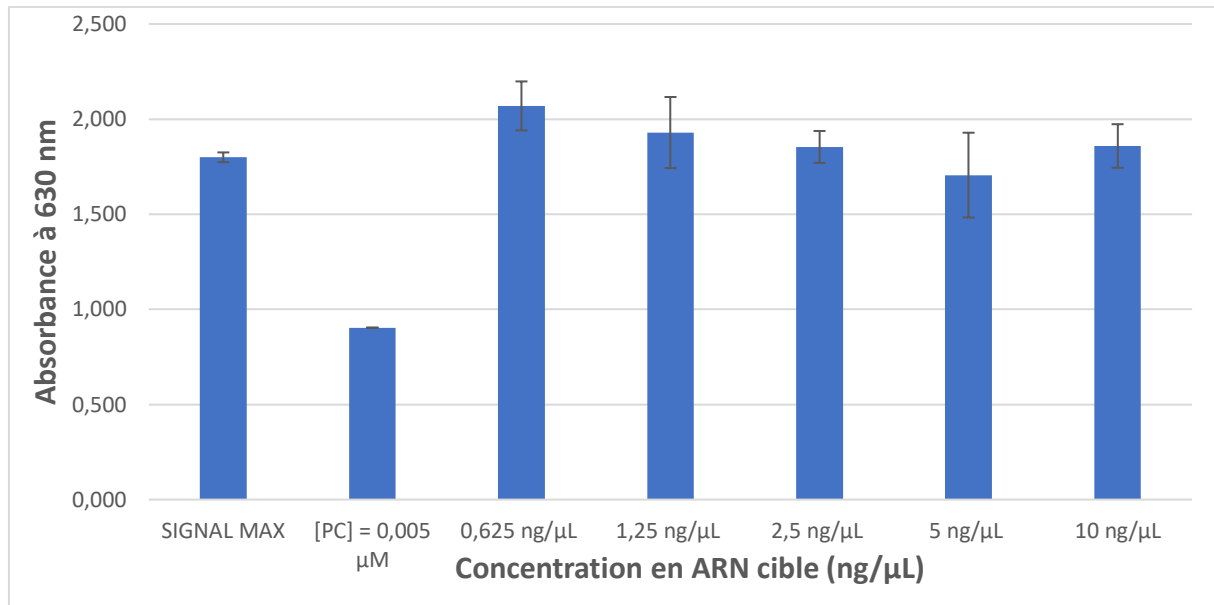


Figure 11 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de *Vibrio* en fonction de sa concentration

On remarque que malgré l'optimisation des conditions, nous n'obtenons toujours pas de réduction significative du signal (Figure 11).

Suite aux résultats obtenus pour l'ensemble des tests effectués sur des échantillons d'ARN, j'en suis arrivée à la conclusion que lorsque nous ciblons l'ARN 16 S d'espèces de *Vibrio*, nous n'obtenons pas la réduction du signal attendue pour des concentrations en cible inférieures à 100 ng/μL d'échantillon. Ce type de biocapteur ne semble donc pas être suffisamment sensible pour l'analyse d'ARN de *Vibrio* provenant de bactéries présentes dans des prélèvements d'eau de mer.

Cependant, suite aux vérifications sur les conditions optimales j'ai pu commencer à évaluer la spécificité du biocapteur. C'est-à-dire m'assurer qu'une réponse positive (la diminution du signal) ne se produit qu'en présence de *Vibrio* du clade Splendidus ou du genre en général.

3. Evaluation de la spécificité du biocapteur développé

De manière à évaluer la spécificité du biocapteur développé, j'ai tenté de reproduire les tests sur des échantillons d'acides nucléiques phylogénétiquement éloignés :

- Les premiers sont issus de *Vibrio* spp. ou du clade Splendidus ;
- Les seconds sont issus d'espèces bactériennes non *Vibrio*.

Ces tests de spécificité ont été réalisés à la fois sur des échantillons d'ARN et d'ADN.

3.1. Tests de spécificité en présence de cibles ARN

Malgré le manque de sensibilité du biocapteur pour la détection d'ARN, j'ai tenté de mettre en évidence sa spécificité à l'aide de :

- ARN appartenant au genre *Vibrio* spp.
- ARN n'appartenant pas au genre *Vibrio* spp.

Nous nous attendons au résultat suivant : si le biocapteur est spécifique, alors on pourra distinguer une diminution du signal pour l'échantillon d'ARN de *Vibrio* comparativement à celui de non *Vibrio* qui doit rester stable et proche du signal maximum.

La mesure des absorbances est présentée comme suit dans le Tableau 4 :

Tableau 4 : Absorbances à 630 nm obtenues pour un échantillon d'ARN de a. *Vibrio* (*V. campbellii*) et b. non *Vibro* (*Escherichia coli*)

<i>V. campbellii</i>				<i>E. coli</i>			
Cible	Concentration en cible	Moyenne corrigée	Ecart-type	Cible	Concentration en cible	Moyenne corrigée	Ecart-type
/	0 μ M	1,799	0,026	/	0 μ M	1,799	0,026
PC	0,005 μ M	0,903	0,002	PC	0,005 μ M	0,903	0,002
ARN <i>V. campbellii</i>	0,625 ng/ μ L	2,069	0,129	ARN <i>E. coli</i>	0,625 ng/ μ L	1,775	0,126
ARN <i>V. campbellii</i>	1,25 ng/ μ L	1,929	0,187	ARN <i>E. coli</i>	1,25 ng/ μ L	1,513	0,259
ARN <i>V. campbellii</i>	2,5 ng/ μ L	1,854	0,084	ARN <i>E. coli</i>	2,5 ng/ μ L	1,172	0,370
ARN <i>V. campbellii</i>	5 ng/ μ L	1,706	0,223	ARN <i>E. coli</i>	5 ng/ μ L	1,230	0,125
ARN <i>V. campbellii</i>	10 ng/ μ L	1,859	0,115	ARN <i>E. coli</i>	10 ng/ μ L	1,455	0,273

Si l'on compare les absorbances des ARN deux à deux en fonction de leur concentration, on obtient le graphique qui suit (Figure 12) :

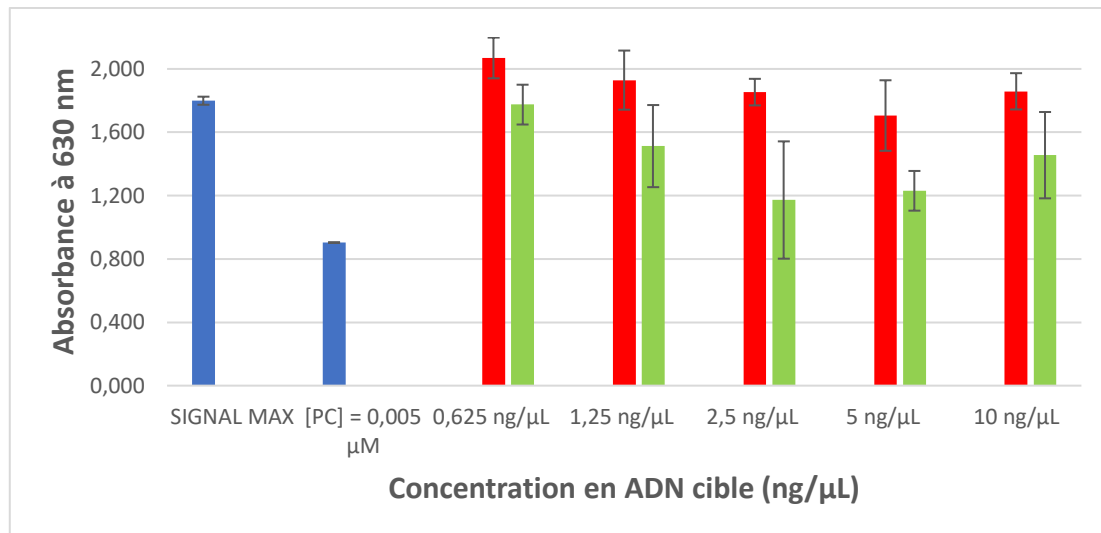


Figure 12 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ARN de *Vibrio* (en rouge) et de non *Vibrio* (en vert) en fonction de leur concentration

On remarque dans un premier temps que la différence de signal entre nos contrôles positifs est suffisamment grande (de l'ordre de 50% d'extinction) pour interpréter nos résultats. De plus, le signal est systématiquement plus faible pour le non *Vibrio* par rapport à celui de *Vibrio*. Par ailleurs, alors que la réponse est stable pour *Vibrio*, elle tend à diminuer pour le non *Vibrio*. Cependant, cette seconde observation doit être prise en compte avec les écart-types qui sont relativement élevé pour cet échantillon. Ces observations vont donc à contre-sens de nos attentes.

Ceci semble indiquer que lorsque l'on cible des ARN, notre biocapteur est peu spécifique.

3.2. Tests de spécificité en présence de cibles ADN

Sachant que la sensibilité du biocapteur est faible lorsque l'on cible l'ARN, nous avons décidé de cibler des ADN en distinguant les échantillons de *Vibrio* et de non *Vibrio*.

Nous avons pu faire ce choix car l'étape de chauffage de la cible en présence de la sonde signal est très proche de l'étape de chauffage lors d'une PCR. Or la PCR mettant en jeu des ADN, nous pouvons dire qu'il s'agit ici d'un mime de PCR. En effet, la sonde signal pourrait représenter les amorces de PCR, car lorsque l'on chauffe durant 3 minutes à 92°C, notre ADN

double brin est dénaturé tandis que la sonde vient s'hybrider sur le brin d'ADN à la séquence complémentaire de la sonde.

Pour ce faire, nous avons réalisé dans un premier temps une extraction d'ADN suivi de son dosage. J'ai réalisé cette manipulation en partant d'une suspension bactérienne d'*E. coli* (DH5 α), cependant, tous les échantillons d'ADN que j'ai pu utiliser durant mon stage ont été extraits puis dosés de ma même manière.

Lors du dosage, au Picogreen, j'ai pu établir la gamme étalon suivante (Tableau 5) :

Tableau 5 : Fluorescence du Picogreen en fonction de la concentration en standard

Gamme étalon						
[C] standard (ng/ μ L)	Fluorescence 1	Fluorescence 2	Fluorescence 3	Moyenne fluorescence	Moyenne fluorescence corrigée	Ecart type
0	0,109	0,103	0,105	0,106	0,000	0,003
0,005	0,275	0,262	0,260	0,266	0,160	0,009
0,05	1,717	1,671	1,685	1,691	1,585	0,024
0,1	3,343	3,209	2,883	3,145	3,039	0,237
0,5	17,23	16,76	16,88	16,96	16,85	0,244
1	33,92	31,71	30,44	32,02	31,92	1,761

A partir de ces valeurs, j'ai pu réaliser la droite d'étalonnage afin d'obtenir l'équation reliant fluorescence et concentration en *E. coli* (Figure 13).

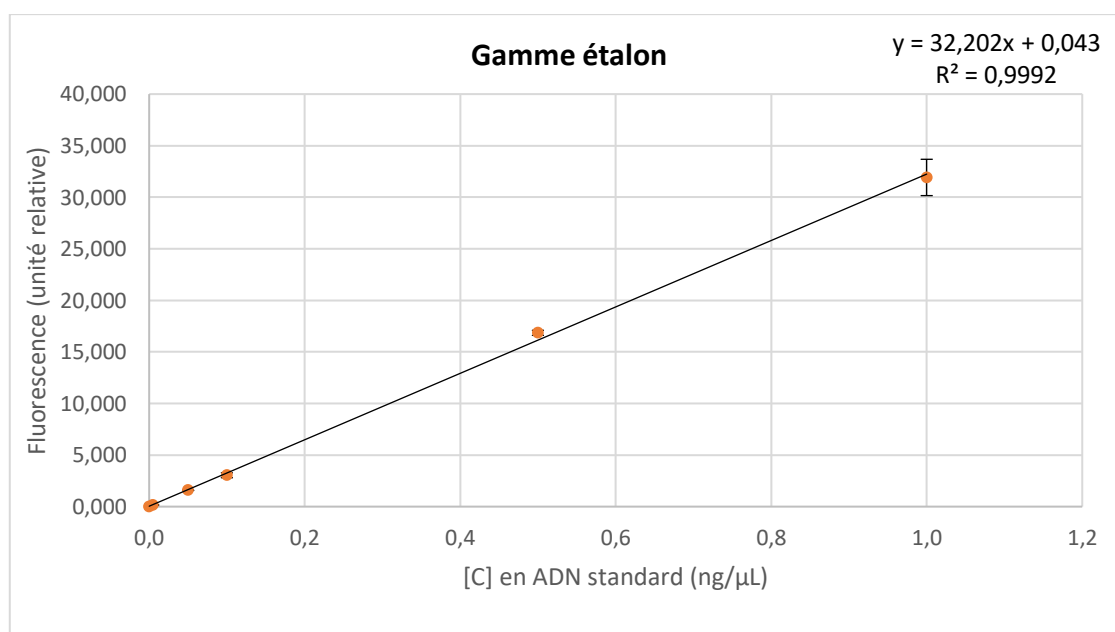


Figure 13 : droite d'étalonnage représentant la fluorescence du Picogreen obtenue en fonction de la concentration en ADN

C'est grâce à l'équation obtenue par la gamme étalon que nous avons pu déduire les concentrations des échantillons d'ADN en fonction de leur fluorescence (Tableau 6) :

Tableau 6 : Fluorescences obtenues pour un extrait d'ADN d'*E. coli*

Echantillons	Fluorescence 1	Fluorescence 2	Fluorescence 3	Moyenne fluorescence	Moyenne fluorescence corrigée	Ecart type	Concentration ADN (ng/μL)	Concentration moyenne ADN (ng/μL)
<i>E. coli</i> (DH5α)								
dilution 1/10000	0,353	0,352	0,352	0,35	0,35	0,001	64,28	75,28
dilution 1/1000	2,817	2,830	2,856	2,83	2,83	0,020	83,44	
dilution 1/100	25,460	25,570	24,900	25,31	25,31	0,359	78,12	

Suite au dosage des ADN extrait, nous avons donc réalisé notre test de spécificité en partant d'échantillon d'ADN de :

- *Vibrio* appartenant au clade Splendidus : *V. splendidus* ;
- Non *Vibrio* : *E. coli*.

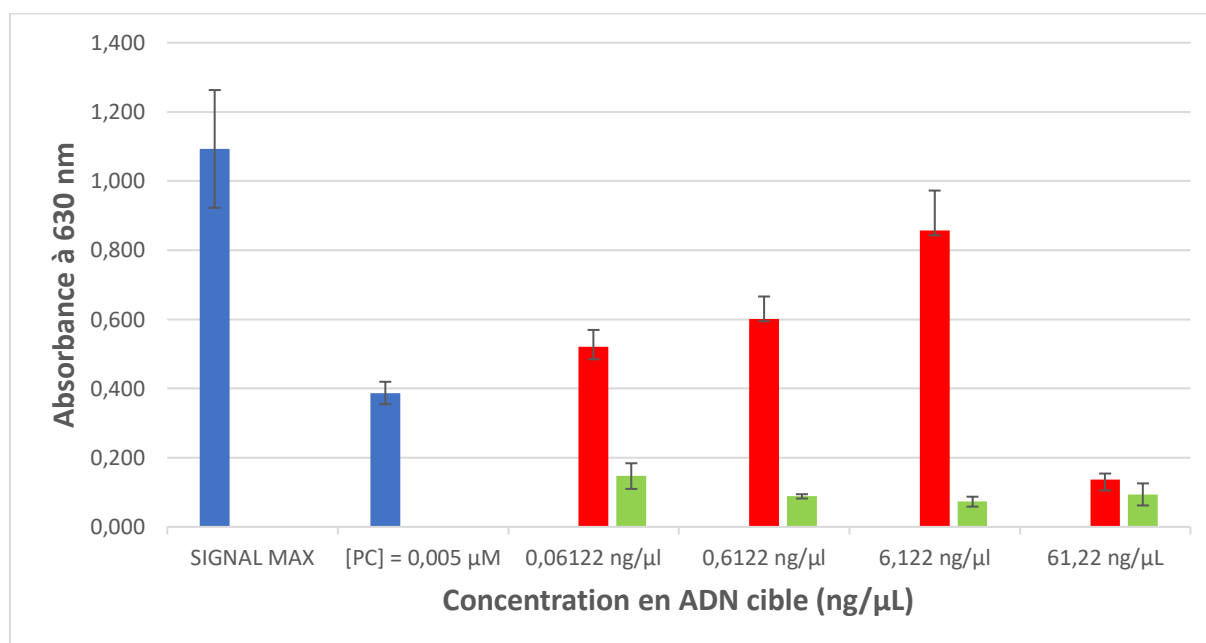


Figure 14 : graphique représentant l'absorbance à 630 nm d'ADN de *Vibrio* (en rouge) et de Non *Vibrio* (en vert) en fonction de leur concentration

Sur la Figure 14, nous remarquons que la réduction du signal entre les contrôles positifs est suffisante (d'environ 60%) pour pouvoir analyser les absorbances résultantes des échantillons d'ADN.

Tout d'abord, la réponse obtenue pour la gamme d'ADN de *Vibrio* se trouve être problématique car, bien que le signal obtenu pour la concentration la plus élevée de la gamme (6,122 ng/μL) soit presque éteint et donc intéressant, la concentration diluée qui suit donne quant à elle un

signal beaucoup plus élevé (réduction de 20% par rapport au signal maximum) et dont l'évolution est inversée à celle attendue. De même, les dilutions suivantes sont également inversées au niveau du résultat. C'est-à-dire que nous souhaitons logiquement voire apparaître une élévation du signal lorsque l'on dilue notre échantillon, cependant ici le signal diminue.

Ensuite, nous remarquons que le signal obtenu pour la gamme de concentration en ADN de non *Vibrio* est très faible voire éteint pour chaque point de mesure. Ceci est problématique car cet ADN d'*E. coli* (qui pour rappel n'appartient pas au genre *Vibrio*) devrait donner une réponse similaire au signal maximum.

Ainsi, la spécificité du biocapteur semble discutable. Cependant, mon stage prenant fin sur ces mesures, il est important de noter qu'il serait essentiel de reproduire des mesures afin d'en retirer une analyse statistiquement correcte.

Conclusion

Ce stage, effectué au sein du BAE, laboratoire de recherche et d'analyses environnementales et agro-alimentaires, a permis la mise en place d'un biocapteur à ADN au format d'hybridation de type piégeage en présence de cibles synthétique (contrôles positifs) et naturelles (acides nucléiques extraits de suspensions bactériennes de souches pures).

Les tests de sensibilité réalisés ont montré que l'hybridation entre les sondes et les ARN cibles manque de sensibilité. La limite de concentration permettant une atténuation du signal pour ces cibles est élevée (supérieure à 100 ng d'ARN / μ L d'échantillon extrait) ce qui ne semble pas être applicable pour des analyses d'échantillons prélevés sur le terrain.

Par ailleurs, les tests de spécificité réalisés ont montré que l'hybridation entre les sondes et les acides nucléiques semble ne pas être spécifique aux *Vibrio*.

D'autre part, durant mon stage, j'ai rapidement été confrontée à un problème majeur : le dysfonctionnement du système qui semblait être du :

- Au marquage à la digoxygénine qui est très sensible ;
- Au fonctionnement des sondes *V. spp.* qui pourraient ne pas être spécifiques.

L'objectif final de ce stage était, pour rappel, de pouvoir analyser des échantillons d'eau de lagunes prélevées sur le terrain afin de déterminer la présence ou l'absence de *Vibrio* et de les quantifier dans le premier cas.

Cependant, les nombreux dysfonctionnements qui se sont présentés lors des tests n'ont pas permis d'arriver jusqu'à cette étape, c'est pourquoi ce rapport se limite à la démarche mise en place pour développer ce type de biocapteur, ainsi qu'à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité du système.

Il serait donc nécessaire de palier à ces problèmes de sondes et de conservation de l'anticorps, avant de pouvoir réévaluer ce double aspect sensibilité/spécificité du biocapteur, pour finalement permettre l'analyse de prélèvement d'eau de lagunes.

Bilan personnel

Tout d'abord, ces dix semaines de stage au BAE m'ont apporté une expérience nouvelle en laboratoire de recherche. J'ai pu expérimenter ce travail complexe qui associe formulation d'hypothèses, expérimentations et analyse scientifique de résultats.

Mes acquis scientifiques ont été réinvestis en mettant en pratique notamment mes connaissances techniques en biologie moléculaire et en microbiologie. De plus, mes connaissances théoriques dans ces domaines m'ont permis d'appréhender avec facilité le principe des biocapteurs à ADN.

De plus, j'aurai eu l'occasion, pendant toute la durée de mon stage, de développer mes compétences organisationnelles tant dans la réalisation des manipulations que dans la mise au point de ce rapport ; compétences indispensables pour travailler dans un laboratoire de recherche.

Par ailleurs, mon stage s'inscrivant dans le cadre d'une fin de thèse, mon champ de prise d'initiatives s'est retrouvé extrêmement restreint. En effet, j'ai dû m'approprier un protocole préétabli et donc évoluer dans ce cadre. Cependant, cette expérience m'a appris à anticiper les événements, notamment par la gestion de mes stocks de solutions et de matériel.

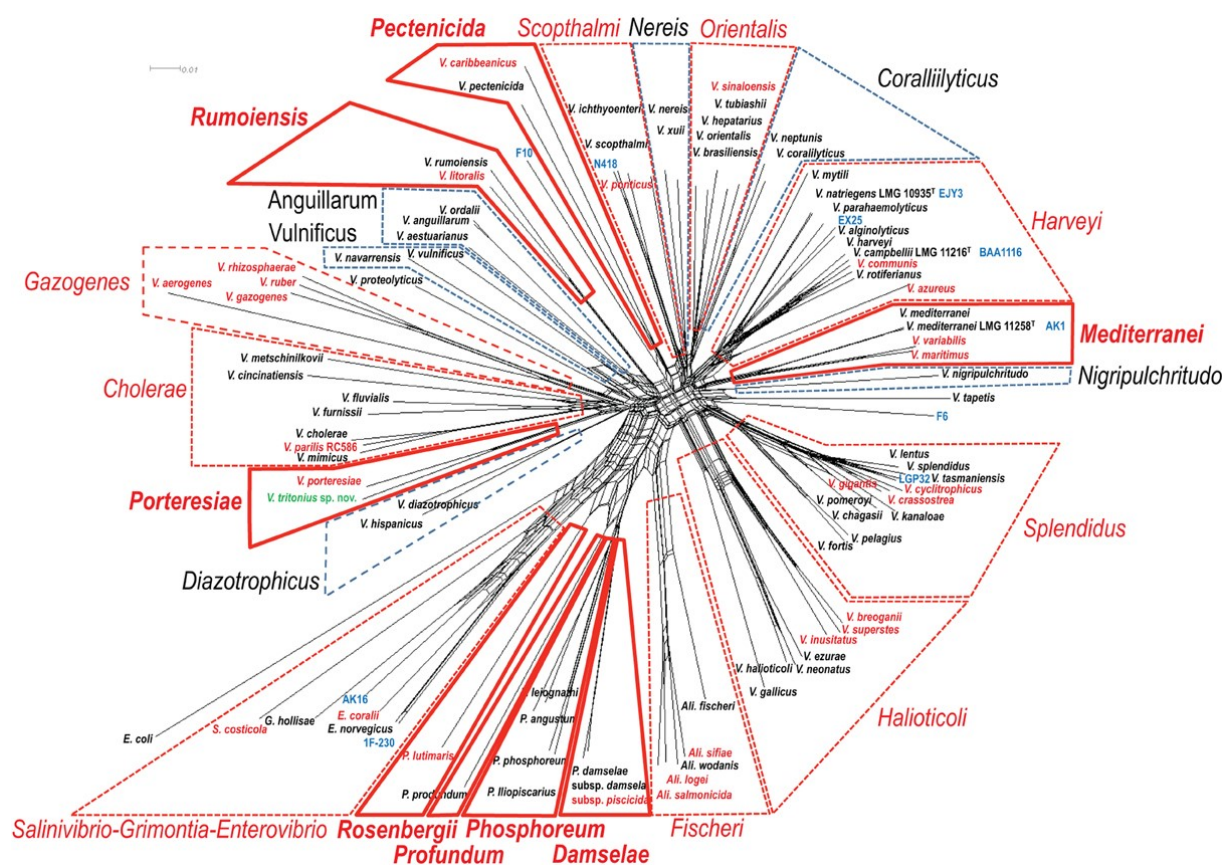
Ensuite, ce stage, et surtout de par la nature expérimentale de l'outil analytique mis au point, m'a amené à alimenter une réflexion continue sur l'analyse de mes résultats et à m'adapter à chaque nouveau constat.

Enfin, si je mets en perspective mes deux stages réalisés en DUT Génie Biologie option Génie de l'Environnement, c'est-à-dire celui-ci avec celui effectué lors de ma première année en bureau d'études, tout aussi intéressant, je note cependant une préférence pour mon travail réalisé en laboratoire de recherche.

Bibliographie

- [1] S. Paz, N. Bisharat, E. Paz, O. Kidar and D. Cohen, 2007, Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel, *Environmental Research*, Vol. 103, Issue 3, pp. 390-396.
- [2] Barbieri, E., L. Falzano, C. Fiorentini, A. Pianetti, W. Baffone, A. Fabbri, P. Matarrese, A. Casiere, M. Katouli, I. Kuhn, R. Mollby, F. Bruscolini, and G. Donelli. 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2748–2753
- [3] P. R. Yaashikaa, A. Saravanan and P. Senthil Kumar, 2016, Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies, *Microbial Pathogenesis*, Vol. 99, pp. 5-13.
- [4] H. I. Reid, J. W. Treasurer, B. Adam and T. H. Birkbeck, 2009, Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio logei*, *Vibrio anguillarum*, and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae, *Aquaculture*, Vol. 288, Issues 1 – 2, pp. 36-43.
- [5] B. Austin and D.A. Austin, 1999, *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, (3rd edn.) Springer, London.
- [6] T. Sawabe, Y. Ogura, Y. Matsumura, G. Feng, AKM Rohul Amin, S. Mino, S. Nakagawa, T. Sawabe, R. Kumar, Y. Fukui, M. Satomi, R. Matsushima, F. L. Thompson, B. Gomez-Gil, R. Christen, F. Maruyama, K. Kurokawa and T. Hayashi, 2013, Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front. Microbiol.*, Vol. 4, Article 414, pp. 7-20
- [7] F. L. Thompson, T. Iida and J. Swings, 2004, Biodiversity of *Vibrios*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68, pp. 403-431
- [8] Cohen N. et Karib H. (2007). *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche : risques et prévention. Les technologies du laboratoire N°3, Mars-Avril 2007
- [9] N. Liu, S. Zhang, W. Zhang and C. Li, 2017, *Vibrio* sp 33 a potential bacterial antagonist of *Vibrio splendidus* pathogenic to sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), *Aquaculture*, Vol. 470, pp. 68-73.
- [10] N. Paniel, J. Baudart, A. Hayat and L. Barthelmebs, 2013, Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples, *Methods* 64, pp. 229–240.
- [11] Tenover, F.C., 1988. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 82.
- [12] N. Paniel and J. Baudart, 2013, Colorimetric and electrochemical genosensors for the detection of *Escherichia coli* DNA without amplification in seawater.
- [13] M. J. DENNISON and A. P. F. TURNER, 1995, Biosensors for environmental monitoring, *Biotech. Adv.* Vol. 13, pp. 1-12.
- [14] E. Da-Silva, L. Barthelmebs, J. Baudart, 2017, Development of a PCR-free DNA-based assay for the specific detection of *Vibrio* species in environmental samples by targeting the 16S *rRNA*, *Environ Sci Pollut Res*, 24:5690-5700

Annexe I : Arbre phylogénétique du genre bactérien *Vibrio*



Annexe II : Composition des tampons utilisés

1. Pour la dissolution / conservation

- Tampon HEPES à 0.1M (pH = 7.2)

$MM_{\text{HEPES}} = 238.305 \text{ g/mol}$

Volume = 500 ml

Il faut ajouter $m_{\text{HEPES}} = MM \times M \times V = 238.305 \times 0.1 \times 0.5 = 12 \text{ g}$ à diluer dans les 500 ml d'eau distillée.

- Tampon PBS-T-BSA (pH = 7.4)

PBS 1 X : V = 19 190 μl

BSA 5% : V = 400 μl

Tween 20 : V = 10 μl

- Binding buffer ou BB 1 X (pH = 7.0 – 7.4)

PBS 1 X : V = 24.25 ml

MgCl_2 (50 mM) : V = 500 μl

Tween 20 : V = 250 μl

2. Pour l'hybridation

- Hybridization buffer 4 X (pH = 8.0)

NaCl (5 M) : V = 12 ml

TrisHCl (1 M) : V = 16 ml

SDS 20 % : V = 400 μl

On complète le volume final à 200 ml par l'ajout de 172 ml d'eau distillée.

3. Pour le rinçage

- POP buffer 10 X (pH = 6.45) – 500 ml

NaH_2PO_4 , H_2O (0.5 M) : $MM = 137.992 \text{ g/mol}$ donc $m = 34.5 \text{ g}$ à peser

NaCl (pH = 6.45, 1 M) : $MM = 58.443 \text{ g/mol}$ donc $m = 29.2 \text{ g}$ à peser

H_2O milli Q (autoclavée) : V = 500 ml

- PBS 1 X (pH = 7.4)

NaCl (Sigma S9888) : $m = 8 \text{ g}$

KCl (Sigma P4504) : $m = 0.2 \text{ g}$

Na_2HPO_4 (Sigma S9763) : $m = 1.44 \text{ g}$

KH_2PO_4 (Sigma P5379) : $m = 0.24 \text{ g}$

H_2O sterile (DEPC) : V = 1 L

Wizard Genomic DNA purification kit

INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION DES PRODUITS A1120, A1123, A1125 ET A1620

Rapide
PROTOCOLE

Purification de l'ADN génomique à partir de bactéries Gram (+) ou Gram (-)



Attention : ce protocole est un protocole abrégé. Avant d'utiliser ce kit pour la première fois, **il est recommandé de lire attentivement le Technical Manual TM050** ;

- Après les centrifugations, attention à ne pas toucher les culots lors des étapes de prélèvement des surnageants.
- Les volumes de solutions sont à adapter proportionnellement à la taille de l'échantillon.

Culot cellulaire

Centrifuger 1ml de culture à 13000-16000g pendant 2min.
Éliminer le surnageant.

A Pour les bactéries Gram (+)

1. resuspendre les cellules dans 480µl d'EDTA 50mM.
2. Ajouter une enzyme lytique (120µl) [Lysosyme et/ou lysostaphin]
3. Incuber à 37°C pendant 30-60min.
4. Centrifuger à 13000-16000g pendant 2min. Éliminer le surnageant
5. Aller à l'étape 1, **Lyse des cellules** (ci-dessous)

B Pour les bactéries Gram (-)

Aller à l'étape 1, **Lyse des cellules** (ci-dessous)

Lyse des cellules

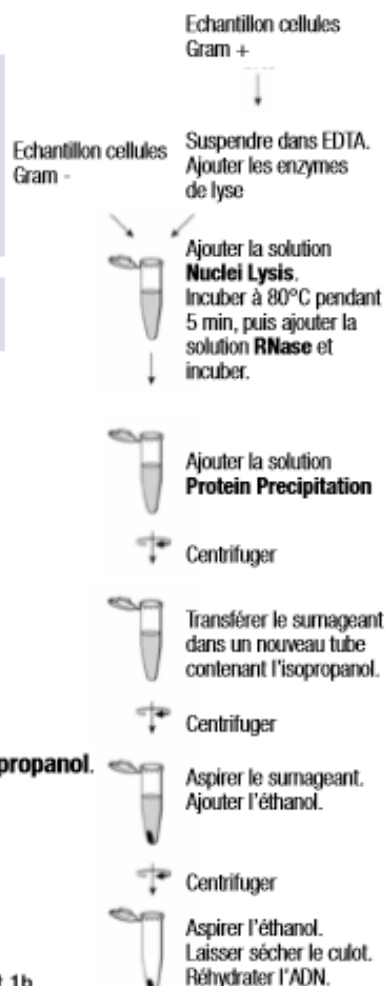
1. Ajouter **600µl de Nuclei Lysis Solution**. Pipeter pour mélanger.
2. Incuber pendant 5min à 80°C puis refroidir à température ambiante.
3. Ajouter **3µl de RNase solution**. Mélanger, incuber à 37°C pendant 15-60min, puis refroidir à température ambiante.

Précipitation des protéines

4. Ajouter **200µl de Protein Precipitation Solution**. Vortexer.
5. Incuber dans la glace pendant 5min.
6. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 3min.

Précipitation et Réhydratation de l'ADN

7. Transférer le surnageant dans un tube propre contenant **600µl d'isopropanol**. Mélanger par inversion jusqu'à apparition des filaments d'ADN.
8. Centrifuger pendant 2min à 13000-16000 g. Éliminer le surnageant.
9. Ajouter **600µl d'Ethanol 70%**. Mélanger.
10. Centrifuger à 13000-16000 g pendant 2min.
11. Aspirer l'éthanol au maximum et faire sécher le culot (tube ouvert) jusqu'à évaporation complète de l'éthanol restant (10-15min).
12. Réhydrater l'ADN dans **100µl de DNA Rehydration Solution** pendant 1h à 65°C ou toute la nuit à 4°C.



Promega

POUR TOUTE INFORMATION TECHNIQUE :
Hotline : 0800 488 000 - www.promega.com

Jun 2007
Part#9FBO22F
© 2004,2005 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Annexe IV : Protocole du dosage d'ADN au Picogreen

Dosage de l'ADN au Picogreen **(High range)**

1. Préparation du tampon TE 1X

La solution commerciale (20X) doit être diluée 20 fois dans de l'eau MilliQ

→ 100 µL TE 20X + 1900 µL eau MilliQ

2. Préparation de la gamme étalon

- Préparer une **solution de travail** (5 ng/µL) à partir de la solution de standard du kit Picogreen (100 ng/µL)

→ 10 µL solution standard 100 ng/µL + 190 µL TE 1X

- Préparer la gamme étalon en réalisant des dilutions en cascade (voir tableau 1)

Tableau 1 : exemple de préparation de la gamme étalon

<u>Dilution</u>	<u>Concentration standard (ng/µL)</u>	<u>Volume standard (µl)</u>	<u>Volume TE 1X (µL)</u>
A	1	60 solution travail	240
B	0,5	150 de A	150
C	0,1	60 de B	240
D	0,05	150 de C	150
E	0,005	20 de D	180
Blanc	0	/	150

- Déposer 50 µL de standard par puit (en triplicats)

3. Préparation des échantillons à doser

- Dilution dépend de l'échantillon à doser (ex : 1 µL échantillon + 49 µL TE 1X)
- Déposer 50 µL d'échantillon dilué par puit (en duplicats ou triplicats suivant volume d'échantillon disponible)

4. Préparation du Picogreen (!!! sensible à la lumière !!! → utiliser aluminium)

- Diluer le Picogreen 200 fois dans TE 1X (ex : 10 µl Picogreen + 1990 µL TE 1X)
- Ajouter 50 µL de Picogreen dans les puits où les standards et les échantillons à doser ont été déposés

→ Incuber la plaque 5 min à température ambiante dans le noir. Lecture avec le Fluoroskan Ascent FL : excitation 485 nm / émission 538 nm

Protocole test colorimétrique pour la détection d'ADN/ARN extraits
Hybridation piégeage

1) Coating des puits : solution de neutravidine 1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ (dans HEPES 0,1 M)

Attention : la neutravidine est photosensible, la protéger de la lumière

- A partir de la solution stock de neutravidine à **2 mg/mL**, préparer une solution fille à **10 $\mu\text{g/mL}$** (dilution 1/200 dans **HEPES 0,1 M**)
 ➔ Les solutions de neutravidine peuvent être préparées à l'avance et sont conservées au congélateur
- Préparer une solution de neutravidine à **1 $\mu\text{g/mL}$** à partir de la solution à 10 $\mu\text{g/mL}$ (dilution 1/10 **HEPES 0,1 M**) (voir tableau ci-dessous).

Nombre de puits	Volume total (μL)	Volume solution fille neutravidine (10 $\mu\text{g/mL}$)	Volume HEPES 0,1 M (μL)
8	800	80	720
16	1600	160	1440
24	2400	240	2160
32	3200	320	2880
40	4000	400	3600

- Déposer **100 μL** de neutravidine à 1 $\mu\text{g/mL}$ dans chaque puits
- Recouvrir la plaque d'aluminium et incuber à température ambiante pendant **au moins 1h** (possibilité d'incuber over night) sous agitation (300 rpm)
- Eliminer l'excès de neutravidine en réalisant **3 lavages** avec **300 μL** de PBS 1X

Attention : **tout au long du protocole**, penser à ne réaliser les lavages que lorsque les réactifs pour l'étape suivante sont prêts car il ne faut pas laisser les puits vides trop longtemps

2) Préparation et fixation de la sonde capture

- A partir de la solution stock à **10 μM** , préparer une solution de sonde capture à **0,1 μM** (dilution 1/100 dans **Bead Buffer**) (voir tableau ci-dessous)

Nombre de puits	Volume total (μL)	Volume sonde capture 10 μM (μL)	Volume Bead Buffer (μL)
8	800	8	792

16	1600	16	1584
24	2400	24	2376
32	3200	32	3168
40	4000	40	3960

- Dénaturation de la sonde **0,1 μM** : 3 min à 90°C (thermomixer agitation 800 rpm)
2 min à 4°C (transférer tubes dans la glace)
5 min à température ambiante
- Déposer **100 μL** de sonde capture dénaturée dans chacun des puits
- Recouvrir la plaque d'aluminium et incuber **30 min** à température ambiante sous agitation (300 rpm)
- Eliminer l'excès de sonde capture en réalisant **3 lavages** avec **300 μL** de tampon **d'hybridation 1X**

3) Blocage des sites non spécifiques à la caséine 1 %

- Préparer la solution de caséine Hammerstein 1% dans du tampon **BB 1X** (voir tableau ci-dessous). Dissoudre la caséine sous agitation, si nécessaire chauffer pour dissoudre plus facilement.

Nombre de puits	Volume total (μL)	Quantité caséine (g)	Volume BB 1x (μL)
8	800	0,008	800
16	1600	0,016	1600
24	2400	0,024	2400
32	3200	0,032	3200
36	3600	0,036	3600
40	4000	0,04	4000

- Déposer **100 μL** de cette solution dans chacun des puits
- Recouvrir la plaque d'aluminium et incuber **45 min** à température ambiante sous agitation (300 rpm)
- Eliminer l'excès de caséine en réalisant **3 lavages** avec **300 μL** de tampon **d'hybridation 1X**

4) Réalisation du mix d'hybridation et étape d'hybridation

- Préparer une solution de sonde signal à **0,01 μM** (dans eau milli Q)
- Préparer le mix d'hybridation :

	1 réplicat	2 réplicats	3 réplicats
Eau milli Q	55 μL	110 μL	165 μL
TP hybridation 4X	25 μL	50 μL	75 μL
Sonde signal 0,01 μM	10 μL	20 μL	30 μL
ADN/ ARN cible ou PC	10 μL	20 μL	30 μL

10 μL de sonde signal à 0,01 μM donc dans mix (100 μL) conc.finale sonde signal est de 0,001 μM

- Incuber **20 min** à 65°C sous agitation (thermomixer 800 rpm)
- Déposer **100 μL** de mix dans chacun des puits
- Recouvrir la plaque d'aluminium et incuber **20 min** à 65°C (température à ajuster en fonction des sondes utilisées) sous agitation (300 rpm)
- Eliminer l'excès de mix en réalisant **3 lavages** avec **300 μL** de tampon **POP 1X**

5) Ajout du conjugué anti-DIG-HRP 50mU/mL

- A partir de la solution stock à **150 U/mL**, préparer une solution fille de conjugué anti-DIG-HRP à **300mU/mL** (dilution au 1/500 dans **PBST-BSA**) puis préparer une solution à **50 mU/mL** à partir de la solution fille (dilution 1/6 dans **PBST-BSA**)
- Déposer **100 μL** de conjugué **50 mU/mL** dans chacun des puits
- Recouvrir la plaque d'aluminium et incuber **20 min** à température ambiante sous agitation (300 rpm). **Bien respecter le temps d'incubation** car il y a une augmentation de l'absorption avec l'augmentation du temps de réaction de 5 à 20 min. Un temps d'incubation supérieur à 20min entraînerait une diminution de la réponse en raison d'une possible dissociation du complexe anti-DIG-HRP-sonde signal.
- Eliminer l'excès de conjugué en réalisant **3 lavages** avec **300 μL** de tampon **POP 1X**

6) Ajout du TMB

- Déposer **100 μL** de TMB dans chacun des puits
- Recouvrir la plaque d'aluminium et incuber **10-15 min** à température ambiante sous agitation (300 rpm)
- Lire immédiatement l'absorbance à 630 nm

Résumé

Mise en place d'un biocapteur à ADN pour la détection de *Vibrio* pathogènes des huîtres creuses de la lagune méditerranéenne.

J'ai réalisé mon stage de deuxième année en DUT Génie Biologique option Génie de l'Environnement au sein du laboratoire de recherche Biocapteurs-Analyses-Environnement, spécialisé dans la mise en place de biocapteurs pour des analyses environnementales. J'ai pris part au développement d'un nouveau type de biocapteur pour la détection de *Vibrio* spp., il s'agit d'un biocapteur à ADN au format d'hybridation de type « piègeage » associé à une détection colorimétrique. Dans un premier temps, ce biocapteur a été calibré à l'aide de cibles synthétiques. Dans un second temps, la sensibilité et la spécificité ont été évaluées, puis les conditions opératoires ont été modifiées afin d'améliorer les performances analytiques du biocapteur. Des expériences complémentaires doivent être réalisées afin d'établir un outil intéressant pour déterminer la présence de *Vibrio* dans des échantillons réels.

Mots-clés : Biocapteur à ADN ; Analyses environnementales ; Détection de *Vibrio* ; Format d'hybridation « piègeage » ; Sensibilité et Spécificité.

Abstract

Development of a genosensor for detection of pathogenics *Vibrio* of oysters from Mediterranean lagoon.

I completed my graduation internship at « Biocapteurs-Analyses-Environnement » research laboratory specialized in biosensor development for environmental analysis. I took part in the development of a new DNA biosensor for *Vibrio* species detection. This biosensor was based on a « trapping » hybridization format combined with a colorimetric detection. In a first step, a calibration curve was performed using synthetic targets. The sensitivity and the specificity were evaluated. Then, experimental conditions were modified in order to improve the analytical performances of the developed biosensor. Further experiments have to be performed to obtain an analytical tool allowing *Vibrio* spp. detection in environmental samples.

Keywords: DNA biosensor ; Environmental analysis ; *Vibrio* detection ; « Trapping » hybridization format ; Sensitivity and Specificity.