



HAL
open science

Développement d'outils analytiques innovants pour le suivi des populations de *Vibrio* dans les environnements aquatiques

Elise Da Silva

► **To cite this version:**

Elise Da Silva. Développement d'outils analytiques innovants pour le suivi des populations de *Vibrio* dans les environnements aquatiques. *Ecologie, Environnement*. Université de Perpignan, 2017. Français. NNT : 2017PERP0057 . tel-02316309

HAL Id: tel-02316309

<https://theses.hal.science/tel-02316309>

Submitted on 15 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale **ED 305**
Et de l'unité de recherche
Biocapteurs-Analyses-Environnement (BAE)
Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies
Microbiennes (LBBM USR 3579)

Spécialité : Biologie

Présentée par **Elise DA-SILVA**

**Développement d'outils analytiques innovants
pour le suivi des populations de *Vibrio* dans les
environnements aquatiques**

Soutenue le 8 décembre 2017 devant le jury composé de

Mme Chantal GONDRAN , Maître de Conférences HDR, Université Grenoble Alpes, France	Rapporteur
Mr Pierre SERVAIS , Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique	Rapporteur
Mme Ana Margarida TRIGO DE SOUSA ROQUE , Chargée de Recherche, IRTA, Espagne	Examineur
Mr Pierre MARCOUX , Ingénieur de Recherche, CEA - LETI MINATEC, France	Examineur
Mr Thierry NOGUER , Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France	Examineur
Mr Régis ROUILLON , Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France	Examineur
Mme Lise BARTHELMEBS , Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France	Directeur de thèse
Mme Julia BAUDART , Maître de Conférences, Université Pierre et Marie Curie, France	Co-directeur de thèse

Remerciements

A l'issue de ces 3 années de thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagné et qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Mme Chantal GONDRAN et Mr. Pierre SERVAIS pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail, ainsi qu'à Mme Ana Margarida TRIGO DE SOUSA ROQUE, Mr. Pierre MARCOUX et Mr. Thierry NOGUER pour avoir pris part à mon jury de thèse.

Un grand merci à ma directrice de thèse Lise BARTHELMEBS, pour sa gentillesse et pour avoir été toujours présente, tout en me laissant de l'autonomie. Merci également de m'avoir permis de réaliser des enseignements, cela aura vraiment été une expérience enrichissante. Merci pour tout !

Je remercie également Julia BAUDART, ma co-directrice de thèse, pour ses conseils avisés, et pour m'avoir guidée pendant ces 3 années de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres du LBBM, de la plateforme Bio2mar et de Microbia Environnement pour le temps qu'ils m'ont accordé lors de ma première année de thèse. Un énorme merci à toi Margot pour l'aide que tu m'as apportée dès mon arrivée au LBBM, pour ces repas au soleil face à la mer et tous ces autres moments de détente avec toi !

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire BAE pour m'avoir permis de travailler chaque jour dans une ambiance agréable ainsi que pour leurs précieux conseils. Gaëlle, merci infiniment pour ta bonne humeur, ton aide ainsi que pour toutes nos discussions qu'elles soient scientifiques ou non ! Amani et Ahmad je vous remercie pour tous ces moments de partage et de rigolades. Amani, un très grand merci pour ta présence et pour toutes ces petites sorties qui m'ont permis de me changer les idées ces dernières semaines de rédaction. Merci également aux étudiantes en stage de l'IUT de Perpignan, Caroline A., Lisa et Caroline C., qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail. Un merci tout particulier à toi ma petite Lisa !

Un immense merci à ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans mes projets. Maman, papa et Vic, merci d'être là pour moi en toutes circonstances ! Papy, marraine, tonton et Charlotte, merci pour votre présence et votre soutien. Je remercie également la famille Klein pour tous les bons moments passés en leur compagnie.

Enfin merci à toi, Jérémy ! Pour m'avoir écoutée, soutenue, encouragée et pour avoir toujours cru en moi. Pour avoir accepté ma passion pour mon travail. Les *Vibrio* et les biocapteurs n'ont désormais plus de secret pour toi ! Tout simplement merci d'être là pour moi.

A ma famille qui m'a toujours soutenue,

Une pensée particulière pour vous, mamie et tonton.

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNg : ADN génomique

APW : eau peptonée alcaline, *alkaline peptone water*

ARN : acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

BSA : albumine de sérum bovin, *bovin serum albumine*

cDNA : ADN complémentaire, *complementary DNA*

Ct : cycle seuil, *cycle threshold*

CTAB : *cetyltrimethyl ammonium bromide*

CV : coefficient de variation

DIG : digoxygénine

DPASV : *differential pulse anodic stripping voltammetry*

DPV : voltammétrie d'impulsion différentielle, *differential pulse voltammetry*

dsDNA : ADN double brin, *double-stranded DNA*

ELISA : *enzyme linked immunosorbent assay*

FAM : fluorescéine amidite

FITC : isothiocyanate de fluorescéine, *fluorescein isothiocyanate*

HRP : peroxydase de raifort, *horseradish peroxidase*

LATE-PCR : *linear after the exponential PCR*

LAMP : *loop-mediated isothermal amplification*

LD : limite de détection, *limit of detection* (LOD)

LFA : *lateral flow assay*

LQ : limite de quantification, *limit of quantification* (LOQ)

LPS : lipopolysaccharide

MAb : anticorps monoclonal, *monoclonal antibody*

MB : bleu de méthylène, *methylene blue*

MLSA : analyse par séquençage multilocus, *multilocus sequence analysis*

MWCNT : nanotubes de carbone multi-parois, *multi-walled carbon nanotubes*

NP : nanoparticules

ORF : cadre de lecture ouvert, *open reading frame*

PAL : phosphatase alcaline, *alkaline phosphatase (ALP)*

PC : contrôle positif, *positive control*

PCR : réaction de polymérisation en chaîne, *polymerase chain reaction*

PNA : acide nucléique peptidique, *peptide nucleic acid*

psu : *practical salinity unit*

qPCR : PCR quantitative, *quantitative PCR*

RIN : *RNA integrity number*

SELEX : évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel, *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*

SERS : spectroscopie Raman exaltée de surface, *surface enhanced Raman spectroscopy*

SPE : électrode sérigraphiée, *screen-printed electrode*

SPR : résonance plasmonique de surface, *surface plasmon resonance*

ssDNA : ADN simple brin, *single-stranded DNA*

TCBS : thiosulfate - citrate - sels biliaires - saccharose

UFC : unité formant colonie, *colony forming unit (CFU)*

UG : unité génome, *genome unit (GU)*

VNC : viable non cultivable, *viable but non culturable (VBNC)*

Sommaire

Introduction générale	1
Contexte scientifique	7
I. Les bactéries appartenant au genre <i>Vibrio</i>	9
I.1. La biologie des <i>Vibrio</i>	9
I.1.1. Les caractéristiques générales	9
I.1.2. Le génome	9
I.1.3. La taxonomie	10
I.2. Les <i>Vibrio</i> pathogènes	12
I.2.1. Les espèces pathogènes de l'Homme	12
I.2.1.1. <i>V. cholerae</i>	13
I.2.1.2. <i>V. parahaemolyticus</i>	14
I.2.1.3. <i>V. vulnificus</i>	14
I.2.1.4. <i>V. alginolyticus</i>	15
I.2.1.5. Les autres espèces.....	15
I.2.2. Les espèces pathogènes rencontrées en aquaculture	16
I.2.2.1. <i>Vibrio</i> pathogènes des poissons et des crustacés	16
I.2.2.2. <i>Vibrio</i> pathogènes des mollusques bivalves.....	18
I.3. Les mécanismes de virulence des <i>Vibrio</i>	19
I.4. L'écologie des <i>Vibrio</i>	21
I.4.1. Occurrence et distribution dans l'environnement	21
I.4.1.1. Influence des paramètres abiotiques.....	21
I.4.1.2. Influence des paramètres biotiques.....	22
I.4.2. Survie des <i>Vibrio</i> dans l'environnement.....	23
I.5. Les principales méthodes de suivi des <i>Vibrio</i> dans l'environnement	24
II. Les biocapteurs : des méthodes alternatives pour la détection des bactéries pathogènes.....	26
II.1. Définition et généralités.....	26
II.2. Les biorécepteurs	27
II.2.1. Les biorécepteurs pour la détection des cellules entières.....	27
II.2.2. Les biorécepteurs pour la détection des acides nucléiques.....	29
II.3. Les méthodes d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur.....	32
II.4. Les méthodes de transduction	33
II.4.1. La transduction optique	34
II.4.2. La transduction mécanique	35

II.4.3. La transduction électrochimique.....	37
II.5. Les biocapteurs développés pour l'analyse des bactéries pathogènes	40
III. Application des biocapteurs et des méthodes de diagnostic rapide dérivées à la détection du genre <i>Vibrio</i>	41
IV. Introduction aux travaux de thèse	76
Chapitre I : Collecte et préparation des échantillons de l'étude	79
I. Introduction.....	81
II. Méthodes de préparation des acides nucléiques à partir de suspensions bactériennes pures ...	82
II.1. Partie expérimentale	82
II.1.1. Souches de référence et conditions de culture.....	82
II.1.2. Méthodes d'extraction des acides nucléiques	83
II.1.2.1. Méthodes d'extraction de l'ADN génomique.....	83
II.1.2.2. Méthodes d'extraction des ARNs totaux	84
II.1.3. Analyse qualitative des acides nucléiques	85
II.1.3.1. Vérification de l'intégrité et de la pureté des extraits d'ADN.....	85
II.1.3.2. Vérification de l'intégrité et de la pureté des extraits d'ARN	86
II.1.4. Analyse quantitative des acides nucléiques.....	87
II.1.4.1. Dosage de l'ADNg	87
II.1.4.2. Dosage des ARNs totaux.....	88
II.2. Résultats et discussion	88
II.2.1. Préparation de l'ADNg.....	88
II.2.2. Préparation des ARNs totaux	93
III. Collecte et préparation des échantillons environnementaux.....	96
III.1. Partie expérimentale	97
III.1.1. Caractéristiques du site atelier.....	97
III.1.2. Collecte et traitement des échantillons	97
III.1.2.1. Collecte des échantillons.....	97
III.1.2.2. Ultrafiltration des échantillons d'eau.....	98
III.1.2.3. Isolement et identification des <i>Vibrio</i> cultivables	99
III.1.2.4. Extractions des acides nucléiques pour la validation des outils analytiques.....	100
III.2. Résultats et discussion	100
III.2.1. Extractions des acides nucléiques pour la validation des outils analytiques	100
III.2.2. Isolement et identification des <i>Vibrio</i> cultivables	102
IV. Conclusions du chapitre	106
Chapitre II : Adaptation et performances analytiques de méthodes de qPCR en temps réel pour la détection et la quantification des <i>Vibrio</i>.....	109

I. Introduction.....	111
II. qPCR TaqMan pour la détection et la quantification du genre <i>Vibrio</i>	113
III. qPCR TaqMan pour la détection et la quantification des espèces de <i>Vibrio</i> appartenant au clade Splendidus	135
III.1. Partie expérimentale	135
III.1.1. Amorces et sonde TaqMan utilisées	135
III.1.2. Conditions d'amplification par qPCR.....	135
III.1.3. Evaluation des performances analytiques de la qPCR	136
III.1.3.1. Détermination de l'efficacité PCR, de la répétabilité et de la reproductibilité.....	136
III.1.3.2. Détermination des limites de détection et de quantification.....	136
III.1.3.3. Evaluation de la spécificité	136
III.1.4. Application de la qPCR à l'analyse d'échantillons environnementaux	137
III.2. Résultats et discussion	137
III.2.1. Evaluation des performances analytiques de la qPCR	137
III.2.1.1. Détermination de l'efficacité PCR, de la répétabilité et de la reproductibilité.....	137
III.2.1.2. Evaluation de la spécificité	140
III.2.2. Application de la qPCR à l'analyse d'échantillons environnementaux	141
IV. Conclusions du chapitre	142
Chapitre III : Développement de génocapteurs pour la détection des <i>Vibrio</i>	145
I. Introduction.....	147
II. Partie expérimentale	148
II.1. Matériels.....	148
II.1.1. Réactifs et solvants.....	148
II.1.2. Composition des tampons.....	149
II.1.3. Supports et appareillages	149
II.2. Formats d'hybridation.....	150
II.2.1. Principe du format d'hybridation « sandwich ».....	150
II.2.2. Principe du format d'hybridation compétitif	150
II.3. Design des sondes	152
II.3.1. Format d'hybridation « sandwich »	152
II.3.2. Format d'hybridation compétitif.....	153
II.4. Choix des supports	154
II.5. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs	156
II.6. Méthodes de transduction.....	156
II.6.1. Format d'hybridation « sandwich »	156
II.6.1.1. Détection en colorimétrie	156

II.6.1.2. Détection en chimiluminescence	158
II.6.2. Format d'hybridation compétitif.....	159
II.6.2.1. Détection en colorimétrie	159
II.6.2.2. Détection en fluorescence	159
II.6.2.3. Détection en électrochimie	159
II.6.2.3.1. Principe de détection	159
II.6.2.3.2. Marquage direct de la sonde signal au bleu de méthylène	160
II.6.2.3.3. Marquage de la sonde signal avec un couple anticorps/enzyme	162
III. Résultats et discussion	163
III.1. Format d'hybridation « sandwich »	163
III.2. Format d'hybridation compétitif.....	178
III.2.1. Détection en colorimétrie	178
III.2.1.1. Optimisation et calibration du système	178
III.2.1.2. Validation du système avec des acides nucléiques extraits de suspensions bactériennes pures.....	179
III.2.1.2.1. Détection de l'ARN	179
III.2.1.2.2. Détection de l'ADN.....	182
III.2.2. Détection en fluorescence	185
III.2.3. Détection en électrochimie.....	186
III.2.3.1. Marquage direct de la sonde signal au bleu de méthylène	186
III.2.3.2. Marquage de la sonde signal avec un couple anticorps/enzyme	188
III.2.3.2.1. Utilisation de l'enzyme HRP	188
III.2.3.2.2. Utilisation de l'enzyme PAL	193
IV. Conclusions du chapitre	195
Conclusion générale et perspectives	197
Annexes.....	207
Bibliographie générale.....	215

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du génome de <i>V. splendidus</i> LGP32 (LeRoux <i>et al.</i> , 2009).....	10
Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse en MLSA de 8 gènes de ménage concaténés (<i>ftsZ</i> , <i>gapA</i> , <i>gyrB</i> , <i>mreB</i> , <i>pyrH</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> , et <i>topA</i>) (Sawabe <i>et al.</i> , 2013)	12
Figure 3 : Principe général du fonctionnement d'un biocapteur.....	26
Figure 4 : Principe d'un aptacapteur développé pour la détection de <i>Salmonella typhimurium</i> (d'après Bagheryan <i>et al.</i> , 2016)	27
Figure 5 : Principe général du processus de SELEX	28
Figure 6 : Principe de fonctionnement des balises moléculaires.....	30
Figure 7 : Principales méthodes d'immobilisation du biorécepteur à la surface du support.....	32
Figure 8 : Principe de fonctionnement d'un dispositif SPR	35
Figure 9 : Représentation schématique d'un microlevier en mode de fonctionnement (A) statique où ΔZ correspond à la déflexion du levier et (B) dynamique (d'après Alvarez et Lechuga, 2010).	36
Figure I-1 : Schéma illustrant les objectifs du chapitre I	82
Figure I-2 : Exemple de résultats obtenus lors de l'analyse au Bioanalyseur (A) d'un extrait d'ARN intact et (B) d'un extrait d'ARN présentant une dégradation importante.....	87
Figure I-3 : Exemple de profils électrophorétiques obtenus à l'aide du Bioanalyseur pour des échantillons d'ADN extraits avec le kit DNeasy® Blood & Tissue.....	91
Figure I-4 : Migration sur gel d'agarose 1% d'extraits d'ADN obtenus avec (A) le kit PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation, et (B) le kit Wizard® Genomic DNA Purification	92
Figure I-5 : Migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits d'ARN total obtenus par la méthode au TRI Reagent®.....	94
Figure I-6 : Migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits d'ARN total obtenus à l'aide du kit UltraClean® Microbial RNA Isolation et de la méthode au TRI Reagent®	95
Figure I-7 : Profils électrophorétiques générés à l'aide du Bioanalyseur pour les extraits d'ARN obtenus avec la méthode au TRI-Reagent®.....	96
Figure I-8 : Cartographie de l'étang de Salses-Leucate (Ladagnous et Le Bec, 1997).....	98
Figure I-9 : Migration sur gel d'agarose 1,2% d'ARN totaux extraits d'échantillons environnementaux par la méthode au TRI Reagent®	101
Figure I-10 : Ensemble des souches cultivables collectées dans la lagune de Salses-Leucate et isolées à 25°C	103
Figure I-11 : Diversité des souches de <i>Vibrio</i> cultivables isolées à 25°C, par site et par date	105
Figure I-12 : Méthodes d'extraction et de dosage des acides nucléiques issus de souches pures et d'échantillons environnementaux utilisés pour la validation des outils analytiques	107
Figure II-1 : Principes de fonctionnement des qPCR (A) SybrGreen et (B) TaqMan (adapté de Poitras et Houde, 2002).....	112
Figure II-2 : Exemple de courbe de calibration obtenue pour des concentrations en standard comprises entre $8,6 \cdot 10^6$ UG. μL^{-1} et 86 UG. μL^{-1}	137
Figure II-3 : Détermination de la limite de détection correspondant à la plus faible concentration en ADN génomique pour laquelle au moins 90% des échantillons sont positifs.....	138
Figure II-4 : Détermination de la limite de quantification	139
Figure III-1 : Principe général de fonctionnement d'un gécapteur	147
Figure III-2 : Principe du format d'hybridation « sandwich » développé dans cette thèse.....	150

Figure III-3 : Principe de fonctionnement du système d'immunodétection en flux AWACSS (Tschmelak <i>et al.</i> , 2005).....	151
Figure III-4 : Principe du format d'hybridation compétitif développé dans cette thèse, ici dans le cas d'une détection colorimétrique	151
Figure III-5 : Schéma d'une électrode de carbone sérigraphiée produite au laboratoire	155
Figure III-6 : (A) Etapes de fabrication des électrodes sérigraphiées et (B) système de sérigraphie semi-automatique DEK 248 employé au laboratoire.....	155
Figure III-7 : Stratégies d'immobilisation utilisées dans cette étude pour l'immobilisation des sondes ADN à la surface du support.....	156
Figure III-8 : Réaction d'oxydation du TMB par l'HRP en présence de peroxyde d'hydrogène (d'après Chai <i>et al.</i> , 2015).....	157
Figure III-9 : Réaction de chimiluminescence par oxydation du luminol (d'après Schutz Geschwender, 2013).....	158
Figure III-10 : (A) Séquence de potentiel utilisée en DPV et (B) allure d'une courbe courant/potentiel obtenue	160
Figure III-11 : Réaction d'oxydo-réduction du bleu de méthylène (d'après Farjami <i>et al.</i> , 2010).....	160
Figure III-12 : Principe de détection électrochimique utilisé en format compétitif en présence d'un marquage enzymatique avec l'HRP.....	162
Figure III-13 : Principe de détection électrochimique utilisé en format compétitif en présence d'un marquage enzymatique avec la PAL.....	162
Figure III-14 : Exemple de migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits d'ARNs totaux après application du protocole de fragmentation	177
Figure III-15 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) en fonction de la concentration en PC.....	179
Figure III-16 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ARN total de <i>Vibrio</i> comprises entre 0 et 50 ng. μL^{-1} (n=3)	180
Figure III-17 : (A) Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ARN de <i>Vibrio</i> comprises entre 0 et 380 ng. μL^{-1} (n=3)	180
Figure III-18 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des échantillons sans ARN ou avec de l'ARN total de <i>Vibrio</i> à 50 ng. μL^{-1} fragmenté ou non (n=3).....	181
Figure III-19 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ARN total de <i>Vibrio</i> (rouge) et non <i>Vibrio</i> (bleu) comprises entre 6,25 et 100 ng. μL^{-1} (n=3).....	181
Figure III-20 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des solutions de sonde signal non chauffées ou soumises à différentes conditions de température (n=3 pour la condition « sans chauffage » ; n=1 pour les 3 autres conditions).....	182
Figure III-21 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des échantillons sans ADN, ou avec des concentrations en ADN de <i>Vibrio</i> ou de non <i>Vibrio</i> de 40 ng. μL^{-1} (n=3)	183
Figure III-22 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ADN de <i>Vibrio</i> (rouge) et non <i>Vibrio</i> (bleu) comprises entre 0,061 et 61 ng. μL^{-1} (n=3)	184
Figure III-23 : Fluorescence mesurée pour différentes concentrations en sonde signal marquée avec la FAM (n=3).....	185
Figure III-24 : Marquage au MB. Voltammogramme en DPV pour 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture immobilisée et de sonde signal	186
Figure III-25 : Marquage au MB. Voltammogramme en DPV pour 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal adsorbée à la surface de l'électrode de travail	187

Figure III-26 : Voltammogramme en DPV pour différentes concentrations en MB dilué dans de l'eau ultra pure.....	187
Figure III-27 : Marquage à l'HRP. Voltammogramme en DPV pour 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture immobilisée et de sonde signal	188
Figure III-28 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sondes capture et signal	189
Figure III-29 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et de sonde signal ainsi qu'un blocage à l'éthanolamine	190
Figure III-30 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal ainsi qu'un blocage à l'éthanolamine.	190
Figure III-31 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal ainsi qu'un double blocage éthanolamine/caséine	191
Figure III-32 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal, un double blocage éthanolamine/caséine et la modification du tampon de rinçage	191
Figure III-33 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal, un double blocage éthanolamine/caséine, la modification du tampon de rinçage ainsi que l'ajout de BSA dans la solution d'anticorps/HRP.	192
Figure III-34 : Marquage à l'HRP. Courants mesurés en DPV pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une concentration en sonde capture de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et en sonde signal de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	193
Figure III-35 : Marquage à la PAL. Courants mesurés en DPV pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une concentration en sonde capture de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et en sonde signal de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	193
Figure III-36 : Marquage à la PAL. Courants mesurés en DPV pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une concentration en sonde capture de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et en sonde signal de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	194

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes de l'Homme et les pathologies associées (adapté de West, 1989).....	13
Tableau 2 : Espèces à l'origine de vibrioses chez les poissons et les crustacés.....	17
Tableau 3 : Espèces de <i>Vibrio</i> associées à des épisodes de mortalités chez les mollusques bivalves..	18
Tableau 4 : Facteurs de virulence rencontrés chez les <i>Vibrio</i> et leurs rôles.....	20
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différents types de biorécepteurs pour la détection de bactéries pathogènes	31
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur.....	33
Tableau 7 : Avantages et inconvénients des principaux types de transducteurs employés pour la détection de bactéries.....	39
Tableau I-1 : Ensemble des souches bactériennes utilisées au cours de l'étude	83
Tableau I-2 : Ratio A260/280 mesuré à l'aide des spectrophotomètres NanoVue™ Plus et NanoDrop™ 1000 pour des échantillons d'ADN extraits à partir de 21 souches de <i>Vibrio</i> avec le kit DNeasy® Blood & Tissue	89
Tableau I-3 : Concentrations en ADN déterminées à l'aide des spectrophotomètres NanoVue™ Plus et NanoDrop™ 1000 ainsi que par dosage au PicoGreen® pour les extraits obtenus à partir de 21 souches de <i>Vibrio</i> avec le kit DNeasy® Blood & Tissue	90
Tableau I-4 : Dosage au PicoGreen® des extraits d'ADN obtenus à l'aide des kits PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation et Wizard® Genomic DNA Purification.....	93
Tableau I-5 : Valeurs de dénombrement sur TCBS pour l'ensemble des échantillons d'eau et de plancton collectés au cours de cette étude	103
Tableau II-1 : Séquences des amorces et de la sonde TaqMan utilisées pour la quantification des espèces appartenant au clade Splendidus par qPCR	135
Tableau II-2 : Détermination de la limite de quantification à partir de solutions contenant 25, 50 et 100 UG.µL ⁻¹ analysées 8 fois.....	139
Tableau II-3 : Liste des souches bactériennes utilisées afin d'évaluer la spécificité de la qPCR clade Splendidus	141
Tableau III-1 : Séquences des sondes et PC utilisés en format d'hybridation « sandwich »	153
Tableau III-2 : Séquences des sondes et PC utilisés en format d'hybridation compétitif	154

Introduction générale

La contamination microbiologique des écosystèmes aquatiques constitue aujourd'hui une préoccupation majeure en raison de ses répercussions en santé publique et des pertes économiques engendrées. Les maladies infectieuses d'origine hydrique, causées par l'ingestion, l'inhalation ou par simple contact avec de l'eau contaminée par des agents pathogènes tels que les bactéries, les virus ou les protozoaires, entraînent chaque année plus de 2,2 millions de décès dans le monde (WHO, 2003). Ces dix dernières années, l'émergence de ces maladies associées à des agents pathogènes nouvellement identifiés ou liées à l'augmentation de l'incidence d'agents déjà décrits, a été constatée à travers le monde (Vouga et Greub, 2015 ; Cleaveland *et al.*, 2007).

Parmi les pathogènes émergents, le genre *Vibrio* représente l'un des groupes bactériens les plus largement distribués au sein des écosystèmes côtiers. Ce genre recense plus de 100 espèces dont 12 au moins sont pathogènes pour l'homme et/ou associées à des toxi-infections alimentaires, comme *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, ou encore *V. vulnificus*, ainsi qu'un grand nombre d'espèces pathogènes pour les vertébrés et les invertébrés marins (West, 1989 ; Austin, 2010). Au cours des dix dernières années, les toxi-infections alimentaires causées par l'ingestion de coquillages contaminés par certaines bactéries du genre *Vibrio* ont significativement augmenté notamment aux Etats-Unis, au Canada, en Asie et en Inde. Bien que l'incidence du genre *Vibrio* soit considérée comme relativement faible en Europe, certains pays européens assistent à l'émergence de ce pathogène et le risque potentiel d'infections doit donc être pris au sérieux (Le Roux *et al.*, 2015). En France, depuis 2008, les *Vibrio* sont à l'origine d'épisodes de mortalité massive chez les huîtres creuses *Crassostreae gigas*. Ces mortalités sont principalement observées chez les huîtres juvéniles et peuvent atteindre 80 à 100 % de la production limitant ainsi la viabilité économique de l'ostréiculture (Thompson *et al.*, 2004 ; Pernet *et al.*, 2012 ; Petton *et al.*, 2013). Ces mortalités massives ayant de fortes répercussions socio-économiques à l'échelle nationale et européenne, il semble ainsi nécessaire de mettre en place une surveillance environnementale des *Vibrio* en développant des outils innovants permettant un suivi rapide et en temps réel dans les milieux aquatiques afin d'anticiper les contaminations.

La détection des *Vibrio* dans l'environnement repose classiquement sur des méthodes microbiologiques conventionnelles comportant une étape d'isolement sur milieu sélectif suivie d'une étape d'identification à l'aide de tests phénotypiques et biochimiques. Bien

qu'efficaces, ces techniques s'avèrent longues à mettre en œuvre et fastidieuses, retardant ainsi l'identification du ou des agents responsables de l'infection et rendant par conséquent une anticipation de la contamination difficile. De plus, sous l'effet de facteurs environnementaux, les *Vibrio* sont capables d'entrer dans un état de cellule viable non cultivable (VNC) rendant leur détection impossible par des méthodes culturales (Baffone *et al.*, 2003 ; Coutard *et al.*, 2005 ; Amel *et al.*, 2008). D'autres approches d'identification basées sur des méthodes immunologiques ou de biologie moléculaire telle que l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont également appliquées à la détection, la quantification ainsi qu'à la différenciation de ces bactéries (Goel *et al.*, 2005 ; Tall *et al.*, 2012 ; Garrido-Maestu *et al.*, 2014 ; Laczka *et al.*, 2014). Néanmoins, ces techniques nécessitent généralement un personnel qualifié, et sont inadaptées à une détection en temps réel, directement sur le terrain en raison de l'utilisation d'appareils dédiés au laboratoire. Au cours des dix dernières années, les biocapteurs ont fait l'objet de recherches intensives et apparaissent aujourd'hui, de par leur rapidité d'analyse, leur simplicité et leur capacité de miniaturisation, comme des méthodes alternatives prometteuses pour la détection des pathogènes dans l'environnement (Nayak *et al.*, 2009 ; Tosar *et al.*, 2010 ; Ahmed *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, ces travaux proposent de développer des **outils analytiques de type biocapteurs pour le suivi des populations de *Vibrio*** dans les écosystèmes aquatiques. Ces outils doivent permettre de cibler 2 niveaux : la totalité du **genre *Vibrio*** au sein de la communauté microbienne et le **clade *Splendidus*** regroupant de nombreuses espèces de *Vibrio* pathogènes d'organismes aquatiques, notamment des huîtres creuses. Ces travaux s'intègrent au sein d'un projet de recherche plus large dont l'objectif est de développer des biocapteurs ne nécessitant aucune étape d'amplification par PCR des acides nucléiques cibles pour la détection des pathogènes en milieu marin et d'ensuite intégrer ces outils au sein d'une plateforme en microfluidique. Le transfert des biocapteurs à des plateformes d'analyse autonomes placées dans les milieux aquatiques offrirait l'accès à des mesures *in situ* et en temps réel. Ces plateformes permettraient (i) d'établir en temps réel des diagnostics de contamination des milieux, (ii) d'étudier à haute fréquence la dynamique spatio-temporelle du pathogène et celle des facteurs environnementaux qu'il est possible aujourd'hui de mesurer en continu et (iii) d'apporter de nouveaux éléments de réponse quant aux facteurs environnementaux qui régulent la dynamique des pathogènes en termes d'abondance et de

diversité. Ce projet regroupe le laboratoire Biocapteurs Analyses Environnement (BAE) de l'Université de Perpignan Via Domitia, possédant une expertise reconnue dans la mise au point de biocapteurs pour des applications dans les domaines de l'agro-alimentaire et de l'environnement, et le Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM-USR CNRS 3579) de Banyuls-sur-Mer étudiant la biodiversité et le rôle fonctionnel des microorganismes au sein des écosystèmes aquatiques. Ces deux laboratoires sont aujourd'hui officiellement associés, BAE étant « équipe projet » du LBBM USR 3579 UPMC-CNRS depuis janvier 2017.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une **étude bibliographique** présentant tout d'abord la **biologie des *Vibrio***, leur **écologie** ainsi que les **méthodes de détection** couramment employées afin de les détecter dans l'environnement. Le principe de **fonctionnement des biocapteurs** est ensuite décrit, en insistant sur les outils développés pour l'étude des bactéries pathogènes. Cette étude se termine par un **état de l'art des biocapteurs et des méthodes de diagnostic rapide dérivées** utilisées pour la détection du genre *Vibrio*, permettant ainsi de replacer les objectifs de la thèse dans leur contexte.

Contexte scientifique

I. Les bactéries appartenant au genre *Vibrio*

I.1. La biologie des *Vibrio*

I.1.1. Les caractéristiques générales

Les *Vibrio* appartiennent à la classe des γ -Proteobacteria et plus particulièrement à la famille des *Vibrionaceae*. Il s'agit de bacilles à Gram négatif d'environ 0,5 à 1 μm de diamètre sur 1,2 à 3,5 μm de longueur, pour la plupart mobiles grâce à la présence d'un voire plusieurs flagelles, ne produisant pas de spores, aérobies anaérobies facultatifs, oxydase positifs et présentant un métabolisme fermentaire facultatif (Thompson *et al.*, 2004). Ce sont des bactéries halophiles, à l'exception de l'espèce *V. cholerae* également capable de croître en eau douce. De fait, la plupart des *Vibrio* sont ubiquistes des écosystèmes aquatiques, notamment des eaux marines et estuariennes (Naracci *et al.*, 2014). Ils sont rencontrés soit sous forme libre dans la colonne d'eau, soit sous forme de biofilms à la surface du phytoplancton et du zooplancton, de macroalgues, des sédiments ou encore de débris plastiques (Heidelberg *et al.*, 2002 ; Main *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2008 ; Zettler *et al.*, 2013). De plus, bien que la plupart des *Vibrio* entretiennent des relations de type commensale ou symbiotique avec des hôtes marins, certaines espèces sont pathogènes de l'Homme et d'animaux aquatiques (McFall-Ngai, 2014 ; Chakraborty *et al.*, 1997 ; Ramamurthy *et al.*, 2014 ; Austin et Austin, 2007 ; Austin, 2010).

I.1.2. Le génome

Le génome des *Vibrio* présente la particularité d'être composé de deux chromosomes circulaires de taille dissemblable. Le chromosome 1, d'une taille d'environ 3 Mb, contient des gènes de fonction cellulaire telle que la réplication, la transcription ou la traduction et des gènes de virulence. Le chromosome 2, de taille plus réduite (entre 1 et 2 Mb), contient une part importante de gènes codants pour des protéines hypothétiques ainsi qu'une région hypervariable appelée « super intégron ». Deux hypothèses ont été proposées afin d'expliquer cette singularité. Le chromosome 2 serait, selon la première hypothèse, un méga plasmide ancestral acquis par transfert horizontal au cours de l'évolution (Heidelberg *et al.*, 2000). La seconde hypothèse propose, quant à elle, que la scission d'un chromosome de grande taille soit à l'origine des deux chromosomes distincts (Waldor et RayChauduri, 2000). A ce jour, les génomes de plusieurs souches de *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000), *V.*

parahaemolyticus (Makino *et al.*, 2003), *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003), *V. harveyi* (Wang *et al.*, 2015), *V. fischeri* (Ruby *et al.*, 2005), *V. anguillarum* (Holm *et al.*, 2015) et *V. splendidus* LGP32 (Le Roux *et al.*, 2009), par la suite renommée *V. tasmaniensis* (**Figure 1**), ont entièrement été séquencés. Les analyses des séquençages de ces différentes souches ont montré que le génome des *Vibrio* est constitué d'un ensemble de gènes communs à toutes les souches d'une même espèce appelé « core » génome et d'un génome accessoire comprenant de nombreux gènes acquis par transferts horizontaux à l'origine d'une importante plasticité génomique.

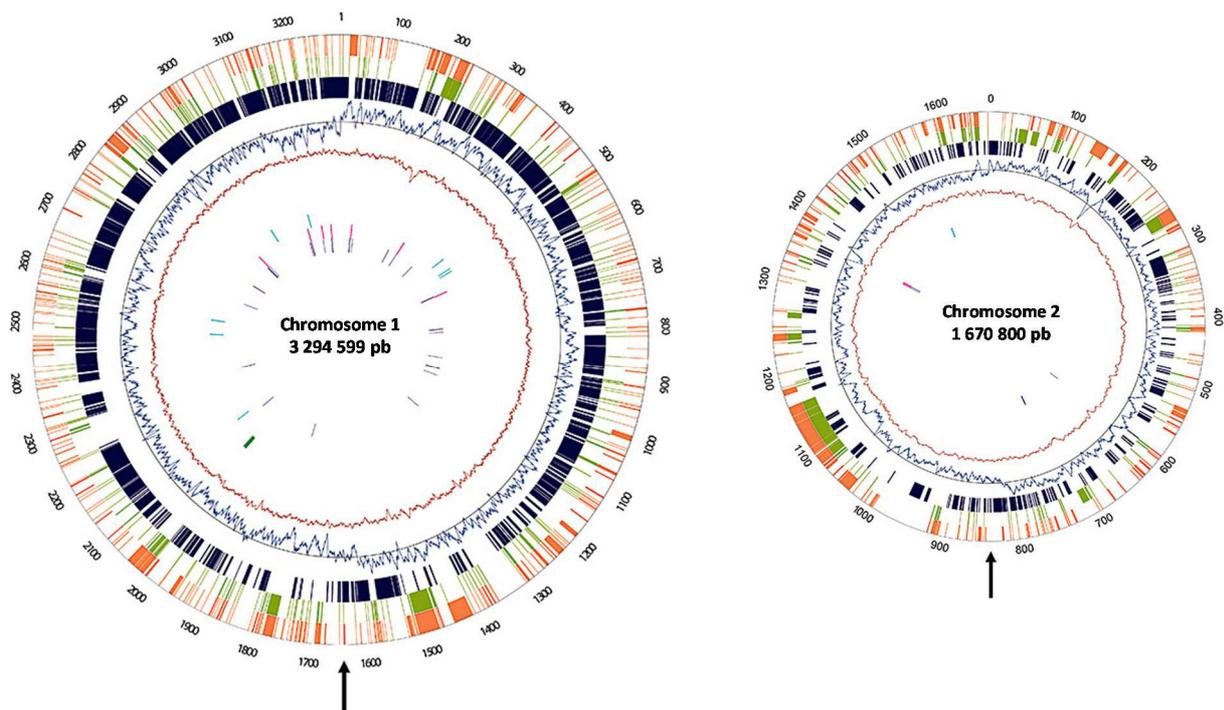


Figure 1 : Organisation du génome de *V. splendidus* LGP32 (LeRoux *et al.*, 2009). De l'extérieur vers l'intérieur : le premier cercle (orange) correspond aux cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame, ORF) présents chez *V. splendidus* LGP32 mais absents des séquences partielles du génome de la souche 12B01 ; le second cercle (vert) représente les ORF présents chez LGP32 mais absents des séquences partielles du génome de *V. splendidus* Med222 ; le troisième cercle (bleu foncé) représente les ORF communs à toutes les espèces de *Vibrio* séquencées ; le quatrième cercle indique le biais de GC et le cinquième le pourcentage de GC par rapport à la moyenne de GC pour le génome ; le sixième cercle correspond aux intégrons et les 7, 8 et 9^{ème} cercle correspondent respectivement aux séquences d'insertion et aux parties codant pour les ARNr et ARNt. Le site *ter* est indiqué par une flèche.

1.1.3. La taxonomie

La classification des *Vibrio* était auparavant basée sur des critères d'identification phénotypiques et biochimiques. Cependant, la variabilité phénotypique des *Vibrio* dans l'environnement ainsi que le caractère non discriminant des critères biochimiques étudiés, limitent l'identification à l'espèce conduisant à des erreurs d'identification. A titre d'exemple, des souches à la base identifiées comme appartenant à l'espèce *V. harveyi* ont été reclassées

par des méthodes d'empreintes moléculaires et d'hybridation ADN-ADN comme appartenant à l'espèce *V. campbellii* (Gomez-Gil *et al.*, 2004).

Le développement du séquençage de gènes ribosomiaux, notamment celui codant pour l'ARNr 16S, a permis de pallier ces limites et d'optimiser l'identification des espèces de nombreux genres bactériens. L'étude de l'ARNr 16S présente cependant des limites dans le cas de l'identification des *Vibrio* puisqu'il s'agit d'un gène très conservé et par conséquent ne permettant pas toujours une identification au niveau de l'espèce (LeRoux *et al.*, 2004 ; Thompson *et al.*, 2005). La recherche de marqueurs moléculaires plus discriminants s'est ainsi révélée nécessaire. Afin de constituer un bon marqueur, le gène choisi doit répondre à plusieurs critères : (i) être présent dans la majorité des génomes, (ii) être unitaire, (iii) la séquence doit être informative mais suffisamment courte pour faciliter le séquençage, (iv) les informations apportées par le marqueur doivent être similaires à celles de l'ARNr 16S et de l'hybridation ADN-ADN et (v) être prédictives du génome entier (Zeigler, 2003). De nombreux gènes de ménage, tels que les gènes *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *pyrH*, *toxR*, *dnaJ*, ou encore *hsp60*, satisfaisant ces critères, sont aujourd'hui couramment utilisés pour l'identification et la mise en évidence de nouvelles espèces de *Vibrio* (LeRoux *et al.*, 2004 ; Thompson *et al.*, 2005 ; Nhung *et al.*, 2007 ; Kwok *et al.*, 2002).

La technique MLSA (MultiLocus Sequence Analysis), basée sur le séquençage de plusieurs de ces gènes de ménage et générant une séquence concaténée, semble constituer la méthode la plus appropriée pour caractériser les liens phylogénétiques entre les espèces du genre *Vibrio*. Cette technique a notamment été utilisée afin d'affiner la classification des *Vibrio*. Ainsi, l'analyse en MLSA de 9 gènes de ménage (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA* et ARNr 16S) a permis de répartir les espèces de *Vibrio* en 14 clades : Anguillarum, Cholerae, Coralliilyticus, Diazotrophicus, Gazogenes, Fischeri, Haliotocoli, Harveyi, Nereis, Nigripulchritudo, Orientalis, Scophtalmi, Splendidus, Vulnificus (Sawabe *et al.*, 2007). Cette classification a ensuite été actualisée par Sawabe *et al.* (2013) en excluant l'ARNr 16S de l'analyse en raison de sa faible résolution interspécifique. Quatre nouveaux clades ont ainsi été identifiés : Mediterranei, Pectenida, Porteresiae, et Rumoiensis (**Figure 2**). L'analyse en MLSA a également permis de mettre à jour les espèces appartenant au clade Splendidus. Par rapport à la classification de Sawabe (2013), six espèces (*V. celticus*, *V. artabrorum*, *V. atlanticus*, *V. hemicentroti*, *V. toranzoniae* et *V. gallaecicus*) ont été rajoutées au sein de ce clade (Pérez-Cataluña *et al.*, 2016).

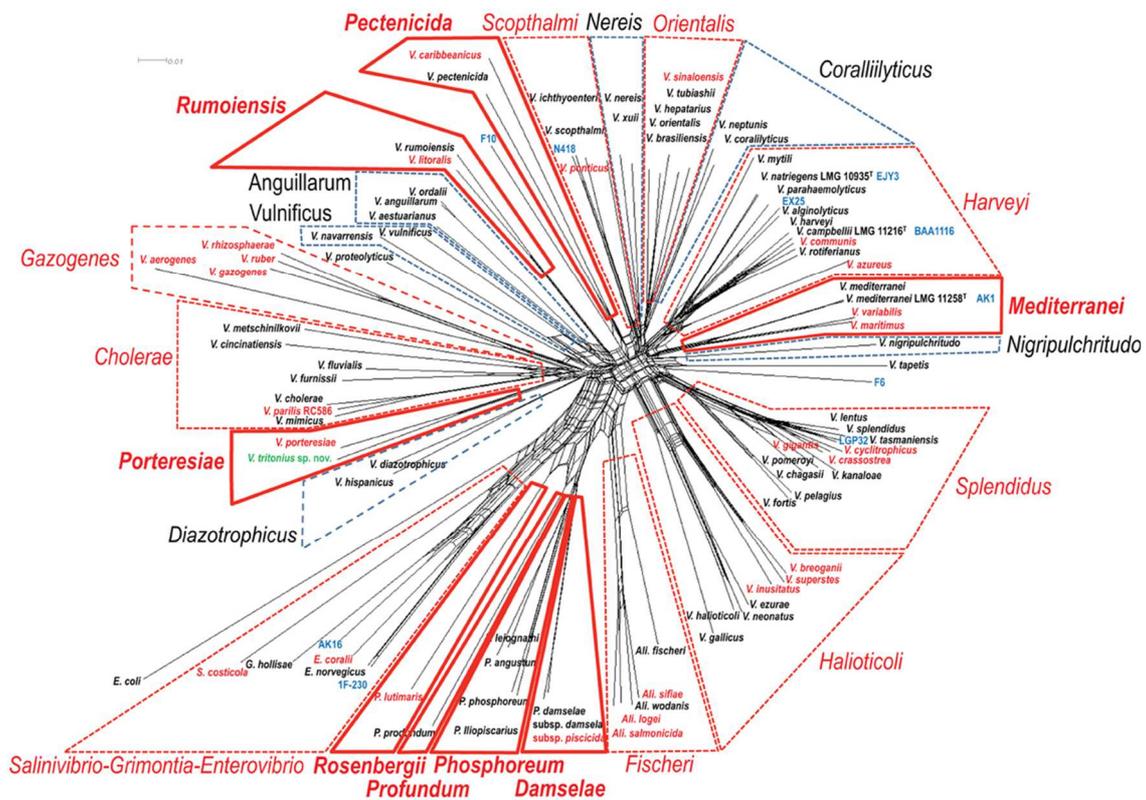


Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse en MLSA de 8 gènes de ménage concaténés (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, et *topA*) (Sawabe *et al.*, 2013). 18 clades ont été définis pour les *Vibrio*. Les clades délimités par un trait rouge plein correspondent aux nouveaux clades proposés, ceux indiqués par un trait pointillé rouge ou bleu sont respectivement les clades qui ont été modifiés et qui restent inchangés par rapport à l'étude de Sawabe *et al.*, 2007.

I.2. Les *Vibrio* pathogènes

Chez les *Vibrio*, les antigènes O, H et K, respectivement localisés au niveau du lipopolysaccharide (LPS), des flagelles et de la capsule, permettent de classer les souches bactériennes appartenant à une même espèce en différents groupes, appelés sérogroupes. Cette classification, basée sur la composition en antigènes structuraux, est particulièrement importante chez les espèces pathogènes puisque certains sérogroupes sont préférentiellement associés à une maladie donnée.

I.2.1. Les espèces pathogènes de l'Homme

Les *Vibrio* pathogènes de l'Homme sont classés en deux grandes catégories (Tantillo *et al.*, 2004) :

- Les *Vibrio* cholériques appartenant aux sérogroupes O1/O139 de *V. cholerae* ;

- Les *Vibrio* non cholériques, appartenant aux sérogroupes non-O1/non-O139 de *V. cholerae* ainsi qu'aux espèces *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. damsela* (renommée *Photobacterium damsela* ; Gauthier *et al.*, 1995), *V. furnissii*, *V. hollisae* (renommée *Grimontia hollisae* ; Thompson *et al.*, 2003), *V. mimicus*, *V. metschnikovii* et *V. cincinnatiensis*.

Les trois principaux types de pathologies associées à chacune des espèces sont présentés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Espèces de *Vibrio* pathogènes de l'Homme et les pathologies associées (West, 1989).

Espèces	Septicémies	Gastroentérites	Infections cutanées
<i>V. cholerae</i> O1/O139	*	+++	+
<i>V. cholerae</i> non-O1/nonO139	+	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+++	++
<i>V. vulnificus</i>	+++	++	+++
<i>V. alginolyticus</i>	+	*	+++
<i>V. fluvialis</i>	*	++	*
<i>V. damsela</i>	*	*	+++
<i>V. furnissii</i>	*	+	*
<i>V. hollisae</i>	+	++	*
<i>V. mimicus</i>	*	++	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	*
<i>V. cincinnatiensis</i>	+	*	*

+++ : association fréquente ; ++ : association possible ; + : association rare ; * : association n'étant pas clairement établie.

Les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. alginolyticus* sont responsables de la plupart des infections observées chez l'Homme et représentent un réel problème de santé publique (Baker-Austin *et al.*, 2016).

1.2.1.1. *V. cholerae*

V. cholerae, initialement observée par Filippo Pacini à Florence en 1854 puis isolée, trente ans plus tard par Robert Koch en Egypte, est la première espèce de *Vibrio* à avoir été découverte (Thompson *et al.*, 2004). A la différence des autres *Vibrio*, cette espèce possède la capacité de se développer en eau douce et est ainsi retrouvée au niveau des eaux côtières et

estuariennes ainsi que dans les rivières. Cette espèce est subdivisée en 200 sérogroupes établis sur la base de l'antigène O (Harris *et al.*, 2012).

Les sérogroupes O1 et O139 sont associés à des épidémies de choléra, une maladie caractérisée par de violentes diarrhées sécrétoires à l'origine d'une intense déshydratation pouvant entraîner la mort en l'absence de traitement rapide (Sack *et al.*, 2004). Bien que la contamination survienne principalement suite à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, le choléra peut également se transmettre de personne à personne. Cette maladie est endémique dans les pays d'Afrique, d'Amérique latine et du sud et de l'est de l'Asie, ayant un accès limité à l'eau potable et aux structures médicales. Dans le reste du monde, seuls quelques cas sporadiques d'importation sont observés (Mandal *et al.*, 2011).

Les vibrions appartenant aux autres sérogroupes causent principalement des gastro-entérites peu sévères mais peuvent également entraîner des infections extra-intestinales telles que des infections des oreilles ou de la peau (Chen *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2015).

1.2.1.2. *V. parahaemolyticus*

L'espèce *V. parahaemolyticus*, isolée pour la première fois en 1950 au Japon, est rencontrée dans les eaux marines et estuariennes (Fujino *et al.*, 1953). Elle est actuellement responsable de la majorité des toxi-infections alimentaires liées à l'ingestion de produits de la mer à l'origine de gastro-entérites aiguës. La contamination peut également survenir par voie cutanée, lors de l'exposition d'une plaie à de l'eau contaminée, et conduire à la nécrose des tissus. La classification des souches appartenant à cette espèce est basée sur l'identification des antigènes O et K. Le clone pandémique O3:K6 a été rencontré pour la première fois en 1996 à Calcutta (Okuda *et al.*, 1997) puis s'est ensuite rapidement répandu aux Etats-Unis, en Amérique du sud ainsi qu'en Europe (Nair *et al.*, 2007). Aujourd'hui, de nouveaux variants pandémiques tels que O4:K12, O4:KUT, O1:K25 et O4:K68, sont observés dans de nombreuses régions du monde (Martinez-Urtaza *et al.*, 2013 ; Turner *et al.*, 2013 ; Ansaruzzaman *et al.*, 2008).

1.2.1.3. *V. vulnificus*

V. vulnificus, isolée pour la première fois en 1964 sous le nom de *V. parahaemolyticus*, a été reconnue comme une espèce à part entière dans les années 1970 (Hollis *et al.*, 1976 ; Blake *et al.*, 1979). Cette espèce a pour habitat naturel les eaux côtières et estuariennes et s'avère être la principale cause de mortalités liées à l'ingestion de fruits de mer contaminés.

A titre d'exemple, aux Etats-Unis, *V. vulnificus* est à l'origine de 95% des décès liés à l'ingestion de fruits de mer (Jones et Oliver, 2009). En Europe, seuls des cas sporadiques ont été recensés. La contamination se fait également par voie cutanée, lors de l'exposition d'une plaie pré-existante à de l'eau contaminée et entraîne des infections nécrosantes (Horseman et Surani, 2011). Chez *V. vulnificus*, les souches sont classées en biotypes, définis sur la base de critères biochimiques. Les souches pathogènes pour l'Homme appartiennent principalement au biotype 1 mais également au biotype 3 (Bisharat *et al.*, 2005).

I.2.1.4. *V. alginolyticus*

V. alginolyticus, isolée pour la première fois en 1997, est l'espèce de *Vibrio* la plus halophile (Smolikova *et al.*, 2001). Elle est ainsi retrouvée dans les écosystèmes marins. Les infections causées par *V. alginolyticus* restent plus rares et moins sévères que celles engendrées par les 3 espèces de *Vibrio* décrites précédemment. Il s'agit principalement d'infections superficielles de la peau et des oreilles. Cependant, une augmentation rapide du nombre d'infections à *V. alginolyticus* a été constatée, notamment aux Etats-Unis (Newton *et al.*, 2012). Une étude réalisée en Floride entre 1998 et 2007 a montré que *V. alginolyticus* représentait une part non négligeable (20%) des infections causées par *Vibrio* chez l'Homme (Weis *et al.*, 2011). En Europe, seuls des cas sporadiques ont été décrits (Schets *et al.*, 2011 ; Reilly *et al.*, 2011).

I.2.1.5. Les autres espèces

Les espèces *V. mimicus*, *G. hollisae*, *V. fluvialis* et *V. furnissii* ont principalement été isolées lors de gastroentérites (Chitov *et al.*, 2009 ; Hineirosa *et al.*, 2007 ; Chowdhury *et al.*, 2012 ; Altekruze *et al.*, 2000) alors que *P. damsela*, *V. cincinnatiensis* et *V. metschnikovii* sont plus particulièrement rencontrées lors d'infections cutanées ou de septicémies (Goodell *et al.*, 2004 ; Hansen *et al.*, 1993). Bien que les vibrioses causées par ces espèces soient moins courantes et généralement moins sévères que celles entraînées par les 4 espèces décrites précédemment, elles doivent être prises en considération. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des transferts horizontaux de gènes dans la distribution des gènes de virulence au sein du genre *Vibrio* (Boyd *et al.*, 2000 ; Baffone *et al.*, 2006 ; Snoussi *et al.*, 2008). Ces phénomènes pourraient ainsi conduire à l'émergence de nouvelles souches pathogènes présentant un réel problème en santé publique.

I.2.2. Les espèces pathogènes rencontrées en aquaculture

D'autres espèces de *Vibrio* sont pathogènes d'organismes marins. Elles sont à l'origine de mortalités massives entraînant d'importantes pertes économiques notamment en aquaculture.

I.2.2.1. *Vibrio* pathogènes des poissons et des crustacés

Afin d'augmenter les rendements de production, les poissons et crustacés sont aujourd'hui couramment soumis à des méthodes d'élevage intensif. Les protéines industrielles apportées aux animaux, l'utilisation massive d'antibiotiques ou encore l'oxygénation artificielle des bassins constituent des conditions favorables à la prolifération des *Vibrio*. Les espèces à l'origine de vibrioses chez les poissons et les crustacés sont regroupées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Espèces à l'origine de vibrioses chez les poissons et les crustacés.

	Espèces pathogènes	Organismes hôtes	Références
Poissons	<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i>	Sole <i>Cynoglossus semilaevis</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	<i>V. alginolyticus</i>	Dorade <i>Sparus sarba</i> , Turbot <i>Scophthalmus maximus</i>	Li <i>et al.</i> , 2003 ; Austin <i>et al.</i> , 1993
	<i>V. anguillarum</i>	Saumon <i>Salmo salar</i> , truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i> , turbot <i>Psetta maxima</i> , dorade <i>Sparus aurata</i> , anguilles <i>Anguilla anguilla</i> et <i>A. japonica</i> , morue <i>Gadus morhua</i>	Toranzo <i>et al.</i> , 2005
	<i>V. cholerae</i> non 01	Ayu <i>Plecoglossus altivelis</i>	Kiiyukia <i>et al.</i> , 1992
	<i>V. harveyi</i>	Merous <i>Epinephelus coicoides</i> et <i>E. malabaricus</i> , cardeau d'été <i>Parachlichthys dentatus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2002 ; Gauger <i>et al.</i> , 2006
	<i>V. ordalii</i>	Saumon <i>Oncorhynchus keta</i>	Ransom <i>et al.</i> , 1984
	<i>V. vulnificus</i>	Anguilles <i>A. anguilla</i> et <i>A. japonica</i> , tilapia du Nil <i>Oreochromis niloticus</i>	Tison <i>et al.</i> , 1982 ; Fouz <i>et al.</i> , 2002
	<i>V. splendidus</i>	Turbot <i>S. maximus</i>	Gatesoupe <i>et al.</i> , 1999
<i>V. salmonicida</i>	Saumon <i>S. salar</i> , truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i> , morue <i>G. morhua</i>	Egidius <i>et al.</i> , 1986 ; Shrøder <i>et al.</i> , 1992 ; Austin et Austin, 2007	
Crustacés	<i>V. alginolyticus</i>	Crevette tigre <i>Penaeus monodon</i> , crevette blanche <i>Litopenaeus vannamei</i> , crabe <i>Charybdis japonica</i>	Liu <i>et al.</i> , 2004 ; Selvin et Lipton, 2003 ; Xu <i>et al.</i> , 2013
	<i>V. harveyi</i>	Crevette tigre <i>P. monodon</i> , crevette blanche <i>L. vannamei</i> , crevette géante <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Jayasree <i>et al.</i> 2006 ; Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> , 1990 ; Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012 ; Siripornadulsil <i>et al.</i> , 2014
	<i>V. parahaemolyticus</i>	Crevette tigre <i>P. monodon</i> , crevette géante <i>M. rosenbergii</i>	Chanratchakool <i>et al.</i> , 1995 ; Tran <i>et al.</i> , 2013 ; Khuntia <i>et al.</i> , 2008
	<i>V. penaeicida</i>	Crevette bleue <i>Litopenaeus stylirostris</i>	Costa <i>et al.</i> , 1998 ; Goarant <i>et al.</i> , 2000
	<i>V. nigripulchritudo</i>	Crevette bleue <i>L. stylirostris</i>	Goarant <i>et al.</i> , 2006
	<i>V. splendidus</i>	Crevette tigre <i>P. monodon</i>	Baticados <i>et al.</i> , 1990 ; Jayasree <i>et al.</i> , 2006
<i>V. vulnificus</i>	Crevette tigre <i>P. monodon</i> , crevette géante <i>M. rosenbergii</i>	Chanratchakool <i>et al.</i> , 1995 ; Jayasree <i>et al.</i> , 2006 ; Sharshar et Azab, 2008	

1.2.2.2. *Vibrio* pathogènes des mollusques bivalves

De par leur activité de filtration, les mollusques bivalves accumulent dans leurs tissus les pathogènes présents dans l'eau environnante. La culture de ces organismes est aujourd'hui sujette à des épisodes de mortalités massives affectant tous les stades de développement que ce soient les stades larvaires, juvéniles ou adultes. Lors des mortalités, les *Vibrio* constituent le genre bactérien le plus fréquemment isolé. Les *Vibrio* pathogènes des mollusques bivalves sont présentés dans le **tableau 3**.

Tableau 3 : Espèces de *Vibrio* associées à des épisodes de mortalités chez les mollusques bivalves. * espèces de *Vibrio* ayant par la suite été reclassées.

Espèces pathogènes	Organismes hôtes	Stades de vie	Références
<u>Clade Anguillarum :</u>			
- <i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>francesis</i>	Huître <i>Crassostrea gigas</i>	Adulte / Juvénile / Larve	Saulnier <i>et al.</i> , 2010 ; Garnier <i>et al.</i> , 2007 ; Garnier <i>et al.</i> , 2008
<u>Clade Coralliilyticus :</u>			
- <i>V. coralliilyticus</i>	Huîtres <i>C. gigas</i> , <i>C. virginica</i> , <i>Ostrea edulis</i> Coquille S ^e Jacques <i>Pecten maximus</i>	Larve	Genard <i>et al.</i> , 2013 ; Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> , 2012 ; Richards <i>et al.</i> , 2015
- <i>V. neptunius</i>	Huître <i>O. edulis</i> , palourde <i>Ruditapes philippinarum</i>	Larve	Prado <i>et al.</i> , 2005 ; Dubert <i>et al.</i> , 2016
- <i>V. ostreicida</i>	Huître <i>O. edulis</i>	Larve	Prado <i>et al.</i> , 2014
<u>Clade Harvevi :</u>			
- <i>V. alginolyticus</i>	Huître <i>C. virginica</i> , <i>O. edulis</i> Palourdes <i>R. decussatus</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> Pétoncle <i>Argopecten purpuratus</i>	Larve / Juvénile Larve Larve	Gomez-León <i>et al.</i> , 2005 ; Tubiash <i>et al.</i> , 1965 ; Riquelme <i>et al.</i> , 1996
<u>Clade Orientalis :</u>			
- <i>V. bivalvicida</i>	Huître <i>O. edulis</i> , palourdes <i>R. decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> , haricot de mer <i>Donax trunculus</i>	Larve	Dubert <i>et al.</i> 2016
- <i>V. europaeus</i>	Palourde <i>R. decussatus</i>	Larve	Dubert <i>et al.</i> , 2017
- <i>V. tubiashii</i> *	Huîtres <i>C. gigas</i> , <i>C. virginica</i> , <i>O. edulis</i> Moule <i>Mytilus edulis</i> Palourde <i>Mercenaria mercenaria</i>	Larve / Juvénile Juvénile Juvénile	Tubiash <i>et al.</i> , 1965 ; Jeffries <i>et al.</i> , 1982 ; Lodeiros <i>et al.</i> , 1987 ; Asplund <i>et al.</i> , 2014
<u>Clade Pectenida :</u>			
- <i>V. pectenida</i>	Coquille S ^e Jacques <i>P. maximus</i>	Larve	Lambert <i>et al.</i> , 1998
<u>Clade Splendidus :</u>			
- <i>V. crassostreae</i>	Huître <i>C. gigas</i>	Larve / Juvénile	Faury <i>et al.</i> , 2004 ; Gay <i>et al.</i> , 2004
- <i>V. splendidus</i> * / <i>V. splendidus</i> like	Huître <i>C. gigas</i> , moules <i>M. edulis</i> et <i>Perna canaliculus</i> , palourde <i>R. decussatus</i> , coquille S ^e Jacques <i>P. maximus</i>	Larve	Torkildsen <i>et al.</i> , 2005 ; Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> , 2009 ; Gomez-León <i>et al.</i> , 2005
- <i>V. tasmaniensis</i>	Huître <i>C. gigas</i>	Larve / Juvénile	Gay <i>et al.</i> , 2004
- <i>V. fortis</i>	Huître <i>C. gigas</i>	Larve	Thompson <i>et al.</i> , 2003
<u>Orphan clade :</u>			
- <i>V. tapetis</i>	Palourdes <i>R. decussatus</i> , <i>R. philippinarum</i> Coque <i>Cerastoderma edule</i>	Juvénile / Adulte Adulte	Paillard <i>et al.</i> , 2006 ; Allam <i>et al.</i> , 2002

Depuis 2008, des épisodes de mortalités massives de l'huître creuse *Crassostreae gigas* sont observés en France, en Espagne, aux Pays-Bas, au Royaume-Uni, en Irlande ainsi qu'aux Etats-Unis (Samain et Mc Combie, 2008). Ces mortalités surviennent généralement en période estivale et peuvent atteindre jusqu'à 80-100% de la production remettant ainsi en cause la pérennité de l'ostréiculture (Thompson *et al.*, 2004). Au cours de ces épisodes, les espèces de *Vibrio* appartenant au clade Splendidus, *V. aestuarianus* ainsi que le virus de type herpes OsHV-1 sont couramment détectés seuls ou en association (Petton *et al.*, 2015 ; Garnier *et al.*, 2008 ; Saulnier *et al.*, 2010 ; Le Roux *et al.*, 2002 ; Gay *et al.*, 2004). Le clade Splendidus constitue le groupe de *Vibrio* dominant dans l'eau et les sédiments et renferme de nombreuses espèces connues pour être pathogènes de bivalves telles que *V. celticus*, *V. crassostreae*, *V. cyclitrophicus*, *V. tasmaniensis* et *V. splendidus* (Travers *et al.*, 2015).

I.3. Les mécanismes de virulence des *Vibrio*

Le cycle d'infection d'un organisme par un pathogène comprend plusieurs étapes. Le pathogène doit : (i) adhérer aux cellules hôtes et les envahir ; (ii) se multiplier et causer des dommages chez son hôte avant d'en ressortir ; (iii) échapper au système immunitaire de l'hôte (Donnenberg *et al.*, 2000). Ces différentes étapes impliquent l'expression de facteurs de virulence. Le **tableau 4** résume les principaux facteurs de virulence identifiés chez les *Vibrio* qu'ils soient pathogènes de l'Homme ou d'organismes marins.

Tableau 4 : Facteurs de virulence rencontrés chez les *Vibrio* et leurs rôles.

	Facteurs de virulence	Rôles majeurs	Références
Adhérence et invasion de l'hôte	<ul style="list-style-type: none"> • Flagelles • Pili • Protéines de membrane externe • Enzymes hydrolytiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Mobilité (swimming et swarming), formation biofilms, adhésion • Mobilité (twitching), formation biofilms, adhésion • Adhésion, invasion, résistance aux peptides antimicrobiens • Invasion <i>via</i> dégradation des tissus hôtes, prolifération 	<p>Duan <i>et al.</i>, 2013 ; McCarter, 2001 ; Lee <i>et al.</i>, 2004 ; Chen <i>et al.</i>, 2008</p> <p>Craig <i>et al.</i>, 2004 ; Reguera et Kolter, 2005 ; Chiavelli <i>et al.</i>, 2001 ; Kirn <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Lin <i>et al.</i>, 2002 ; Liu <i>et al.</i>, 2015 ; Duperthuy <i>et al.</i>, 2011</p> <p>Baffone <i>et al.</i>, 2001 ; Ben Kahla-Nakbi <i>et al.</i>, 2009 ; Mondal <i>et al.</i>, 2014</p>
Endommagement de l'hôte et multiplication	<ul style="list-style-type: none"> • Exotoxines à cible intracellulaire : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Type AB ✓ Injectées • ciblant la membrane plasmique : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hémolysines ✓ Repeats in toxins (RTX) • Endotoxines (LPS) • Sidérophores 	<ul style="list-style-type: none"> • Altération du transport membranaire • Cytotoxicité, entérotoxicité • Lyse des cellules, libération de fer • Entrée des cellules en apoptose • Toxicité, entrée en apoptose, stimulation du système immunitaire de l'hôte • Acquisition du fer 	<p>Viswanathan <i>et al.</i>, 2009 Park <i>et al.</i>, 2004 ; Henke <i>et al.</i>, 2004 ; Dziejman <i>et al.</i>, 2005</p> <p>Robert-Pillot <i>et al.</i>, 2004 ; Olson et Gouaux, 2003 ; Lee <i>et al.</i>, 2008 ; Lin <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Foster <i>et al.</i>, 2000 ; Jones et Oliver, 2009</p> <p>Payne <i>et al.</i>, 2016 ; Tanabe <i>et al.</i>, 2012 ; Naka <i>et al.</i>, 2012</p>
Résistance au système immunitaire de l'hôte	<ul style="list-style-type: none"> • Capsule • Super oxyde dismutase 	<ul style="list-style-type: none"> • Protection contre la phagocytose • Inhibition des espèces réactives de l'oxygène (ROS) 	<p>Wright <i>et al.</i>, 2001 ; Qadri <i>et al.</i>, 2005 ; Hsieh <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Banin <i>et al.</i>, 2003 ; Kang <i>et al.</i>, 2007 ; Le <i>et al.</i>, 2012</p>

Les gènes codant pour ces différents facteurs représentent des cibles potentielles dans la détection des espèces de *Vibrio* et/ou de leur pathogénicité. Cependant, il est important de prendre en compte l'existence de pathotypes, impliquant l'expression de facteurs de virulence différents pour des souches appartenant à une même espèce. Ainsi, deux grands types de facteurs de virulence sont classiquement décrits : les facteurs « majeurs », indispensables au caractère pathogène, tels que la toxine cholérique de *V. cholerae* et les facteurs « accessoires », variables d'une souche à une autre, comme le sidérophore vulnibactine chez *V. vulnificus*. Il est également important de noter que certains de ces facteurs, bien qu'ici classés en catégories, peuvent intervenir lors de plusieurs étapes du cycle d'infection. Enfin, du fait des nombreux transferts horizontaux au sein du genre *Vibrio*, ces facteurs sont généralement partagés par un groupe d'espèces et sont donc rarement attribuables à une espèce spécifique.

I.4. L'écologie des *Vibrio*

Afin de prévenir les risques de vibrions, une meilleure compréhension des paramètres influençant la distribution des espèces de *Vibrio* dans l'environnement est nécessaire. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact de paramètres environnementaux, seuls ou de manière combinée, sur l'abondance et la diversité des *Vibrio*.

I.4.1. Occurrence et distribution dans l'environnement

I.4.1.1. Influence des paramètres abiotiques

La température représente le principal moteur écologique des *Vibrio*. Ce paramètre est à l'origine des variations spatio-temporelles marquées, en termes d'abondance et de diversité, observées chez ces bactéries (Heidelberg *et al.*, 2002 ; Huq *et al.*, 2005 ; Vezzulli *et al.*, 2009 ; Baffone *et al.*, 2006). Les *Vibrio* se développent préférentiellement dans les eaux dont la température est supérieure à 15°C. Ainsi, de fortes concentrations en *Vibrio* sont mesurées durant la période estivale et sont associées à une augmentation des cas de vibrions chez l'Homme et chez les organismes aquatiques. L'occurrence de *V. cholerae* ainsi que les cas de choléra ont, par exemple, été positivement corrélés à la température de l'eau (Gil *et al.*, 2004 ; Huq *et al.*, 2005 ; Luque Fernández *et al.*, 2008). De la même manière, l'abondance de *V. parahaemolyticus* a été corrélée à la température lors de différentes études menées aux Etats-Unis, au Japon, en Inde ou encore en France (De Paola *et al.*, 2003 ; Fukushima *et al.*, 2004 ; Deter *et al.*, 2010 ; Johnson *et al.*, 2012). Cette corrélation a été observée dans d'autres matrices que l'eau telles que les huîtres (Duan *et al.*, 2005) et les sédiments (Blackwell *et al.*, 2008 ; Böer *et al.*, 2013). L'influence de la température sur l'abondance des populations totales de *Vibrio* a également été démontrée (Oberbeckmann *et al.*, 2012 ; Vezzulli *et al.*, 2009). Cependant, la réponse des *Vibrio* aux fluctuations de température ne semble pas être homogène. En effet, une étude réalisée dans la baie de Barnegat aux Etats-Unis a révélé la présence de populations de *Vibrio* distinctes suivant les saisons. Ainsi, *V. campbelli*, *V. parahaemolyticus*, *V. coralliilyticus* et *V. carchariae* constituent les principales espèces rencontrées en été alors que les espèces apparentées à *V. splendidus* dominent durant l'hiver (Thompson *et al.*, 2004).

L'abondance et la distribution des espèces de *Vibrio* dans l'environnement sont également fortement influencées par la salinité (Thompson *et al.*, 2003 ; Eiler *et al.*, 2006 ; Martinez-Urtaza *et al.*, 2008 ; Parveen *et al.*, 2008). Bien que la plupart des *Vibrio* se développent dans

des milieux de salinité comprise entre 5 et 30 psu (practical salinity unit), ils peuvent être rencontrés en dehors de cette gamme lorsque la concentration en nutriments et la température de l'eau sont élevées (Tantillo *et al.*, 2004). Il semblerait qu'il existe des salinités optimales pour chaque espèce de *Vibrio* dans des conditions écologiques spécifiques (Johnson *et al.*, 2015). A titre d'exemple, *V. vulnificus* présente une gamme de salinité optimale allant de 5 à 25 psu expliquant ainsi sa distribution principalement au niveau des estuaires et non dans les eaux marines (Pruzzo *et al.*, 2005). Lipp *et al.* (2001) ont étudié la répartition spatiale de cette espèce dans un estuaire du Golfe du Mexique montrant que la salinité optimale de *V. vulnificus* est de 15 psu. La présence de cette espèce a été corrélée avec la salinité en dessous de 15 psu mais au-dessus de 15 psu aucune corrélation n'est observée entre ces deux paramètres. Les résultats obtenus suggèrent que dans les régions tropicales, telles que le Golfe du Mexique, où les variations de température au cours de l'année sont modérées, la salinité contrôle fortement la distribution géographique et saisonnière des *Vibrio*. A l'inverse, dans les régions tempérées, où la température de l'eau varie davantage au cours de l'année, la salinité n'est qu'un facteur mineur.

D'autres paramètres environnementaux influencent, dans une moindre mesure, l'écologie des *Vibrio*. L'abondance de ce genre bactérien a été positivement corrélée avec la concentration en matières organiques dissoutes, sources de nutriments pour les bactéries favorisant ainsi leur développement (Rehnstam-Holm *et al.*, 2014 ; Pfeffer *et al.*, 2003 ; Mookerjee *et al.*, 2014). A l'inverse, la présence des *Vibrio* dans l'environnement a été négativement corrélée avec la concentration en oxygène dissous dans le milieu. Ce phénomène est lié à une diminution de la concentration en oxygène dissous avec l'augmentation de la température.

1.4.1.2. Influence des paramètres biotiques

L'association des *Vibrio* avec des organismes planctoniques joue également un rôle important dans l'écologie de ces bactéries.

Des études ont montré que la saisonnalité des *Vibrio* est influencée par leur association avec le zooplancton (Heidelberg *et al.*, 2002 ; Turner *et al.*, 2009). Une corrélation positive a été établie entre l'abondance des *Vibrio* et celle des organismes zooplanctoniques (Turner *et al.*, 2009 ; Martinez-Urtaza *et al.*, 2012). La chitine composant l'exosquelette du zooplancton constitue une source importante de nutriments pour les populations de *Vibrio*, favorisant ainsi

leur croissance. De ce fait, le zooplancton représente également un important réservoir ainsi qu'un vecteur de dissémination des vibrions dans l'environnement (Colwell *et al.*, 2003 ; Vezzulli *et al.*, 2010 ; Pruzzo *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont également montré l'association des *Vibrio* avec le phytoplancton (Huq *et al.*, 2005 ; Hsieh *et al.*, 2007 ; Turner *et al.* 2009). Eiler *et al.* (2006) ont mis en évidence une corrélation positive entre l'abondance de dinoflagellés et l'abondance des *Vibrio* totaux. Les matières organiques relarguées lors des blooms phytoplanctoniques sont utilisées comme source d'azote et de carbone par les *Vibrio*, favorisant ainsi leur multiplication (Thompson *et al.*, 2004). De plus, l'adhésion des *Vibrio* au phytoplancton permettrait de protéger ces bactéries de la prédation par les protozoaires (Worden *et al.*, 2006). Il semblerait également que l'abondance des *Vibrio* dans l'environnement soit influencée par la présence d'espèces spécifiques de phytoplancton. Ainsi, une étude menée en mésocosme, a montré une corrélation positive entre l'abondance des *Vibrio* et la diatomée *Coscinodiscus* mais une corrélation négative avec les genres *Chaetoceros* et *Skeletonema* (Rehnstam-Holm *et al.*, 2010).

Les études présentées dans cette partie montrent que l'abondance des *Vibrio* dans l'environnement est souvent influencée par plusieurs paramètres interconnectés rendant ainsi l'étude des facteurs influençant leur dynamique complexe.

1.4.2. Survie des *Vibrio* dans l'environnement

Les variations d'abondance saisonnières observées chez les *Vibrio* sont également étroitement liées à la capacité de ces bactéries à persister dans l'environnement. Plusieurs stratégies de survie sont employées par ces bactéries. Comme cela a été évoqué, les *Vibrio* s'associent avec des surfaces biotiques ou abiotiques, représentant une source importante de nutriments. Cette association peut se traduire par un simple attachement sporadique ou conduire à la formation de biofilms comme cela a été décrit pour les espèces *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. fischeri* (Yildiz et Visick, 2009). La formation de biofilms permet aux *Vibrio* de se protéger contre certains stress environnementaux tels qu'un accès limité aux nutriments, la prédation par les protozoaires ou encore l'infection par des bactériophages (Matz *et al.*, 2005 ; Beyhan et Yildiz, 2007).

Enfin, sous l'effet de stress environnementaux, les *Vibrio* sont capables d'évoluer vers un état VNC se caractérisant par une baisse de l'activité métabolique, une modification

morphologique des cellules ainsi que par le maintien du potentiel de virulence chez certaines souches pathogènes (Oliver, 2005 ; Oliver, 2010). En adoptant cette stratégie de survie, les cellules sont incapables de se développer sur des milieux de culture et ne peuvent donc pas être détectées par des méthodes culture-dépendantes. Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, les cellules VNC sont capables de se multiplier à nouveau (Wong *et al.*, 2004). Cependant, les mécanismes moléculaires permettant la ressuscitation des cellules ne sont pas encore pleinement élucidés.

I.5. Les principales méthodes de suivi des *Vibrio* dans l'environnement

Afin de suivre l'évolution des populations de *Vibrio* dans l'environnement et de comprendre les facteurs responsables de la prolifération des espèces à risque, différentes méthodes de détection et de quantification sont couramment employées.

La recherche des espèces de *Vibrio* est classiquement basée sur des méthodes culturales impliquant des étapes de pré-enrichissement, d'ensemencement sur milieu sélectif suivies par une identification morphologique, biochimique et sérologique des isolats bactériens. Des techniques d'identification standardisées ont d'ailleurs été développées pour les espèces d'intérêt clinique, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* (ISO/TS 21872-1 ; ISO/TS 21872-2). Ces méthodes présentent néanmoins de nombreux inconvénients. Tout d'abord, elles sont laborieuses puisqu'il faut 2 à 3 jours pour obtenir les premiers résultats et au moins 7 jours afin de confirmer un résultat présomptif. De plus, les critères phénotypiques et biochimiques des *Vibrio* étant très variables, notamment pour les souches isolées de l'environnement, ces méthodes sont peu adaptées à l'identification de souches environnementales (Crocchi *et al.*, 2007 ; Vandenberghe *et al.*, 2003). Enfin, ces techniques ne permettent pas la détection des cellules dans un état VNC, conduisant ainsi à une sous-estimation de nombre de cellules viables présentes dans les échantillons analysés (Girard *et al.*, 2017).

Afin de pallier ces limites, d'autres méthodes telle que l'immunofluorescence, basée sur la reconnaissance d'antigènes membranaires par des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes, ont été appliquées à l'étude des *Vibrio* (Chowdhury *et al.*, 1995 ; Marco-Noales *et al.*, 2000 ; Goel *et al.*, 2005). Cependant, ces approches ne permettent pas de distinguer les cellules mortes des cellules actives.

Les progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de développer de nombreux outils sensibles, spécifiques et rapides pour la détection des *Vibrio* dans l'environnement. L'hybridation fluorescente *in situ* utilise de courtes sondes oligonucléotidiques (16-25 nucléotides) marquées avec des fluorochromes et complémentaires de la cible génétique recherchée, généralement l'ARNr 16S. Les cellules, rendues fluorescentes après hybridation des sondes aux cibles, peuvent ensuite être dénombrées par microscopie à épifluorescence ou cytométrie en phase solide. Cette technique permet une quantification rapide et directe des cellules de *Vibrio* mais possède une sensibilité variable, dépendante des outils de détection de fluorescence cellulaire utilisés (Schauer *et al.*, 2012 ; Heidelberg *et al.*, 2002 ; Kirschner *et al.*, 2011). La PCR est aujourd'hui largement utilisée afin d'identifier les différentes espèces de *Vibrio* et de détecter des gènes de virulence spécifiques. Elle peut également être employée en amont d'autres méthodes de détection afin, par exemple, d'amplifier des gènes cibles et ainsi faciliter leur détection ou de caractériser leur variabilité génétique après séquençage. Comparée à la PCR classique, la PCR quantitative en temps réel (qPCR), basée sur le suivi de l'amplification de la cible au cours du temps grâce à un marqueur fluorescent, permet une quantification absolue des gènes d'intérêt à l'aide de standards de dilution. De nombreux protocoles de qPCR ont été développés pour la détection des *Vibrio* notamment pour les espèces *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus* et *V. aestuarianus* (Tall *et al.*, 2012 ; Saulnier *et al.*, 2009 ; Pollock *et al.*, 2010 ; Garrido-Maestu *et al.*, 2015). Cette technique peut être utilisée pour la détection indirecte des *Vibrio* dans des échantillons environnementaux, sans étape de culture ou en complémentarité des méthodes culturales. Cependant, l'inhibition de l'enzyme *Taq* polymérase par certains constituants présents dans les matrices environnementales, tels que les polysaccharides, les polyphénols ou encore les acides humiques, constitue un des principaux inconvénients de cette technique (Schrader *et al.*, 2012).

Depuis une dizaine d'années, de nouveaux outils analytiques, les biocapteurs, font l'objet de recherches intensives et sont proposés comme méthodes alternatives pour la détection et la quantification de bactéries pathogènes tels que les *Vibrio* (Nordin *et al.*, 2017 ; Tam et Thang, 2016 ; Low *et al.*, 2017).

II. Les biocapteurs : des méthodes alternatives pour la détection des bactéries pathogènes

II.1. Définition et généralités

Un biocapteur est un dispositif analytique composé d'un élément de reconnaissance biologique appelé biorécepteur étroitement associé à un élément physique, le transducteur, capable de traduire le phénomène de reconnaissance biologique entre le biorécepteur et la molécule cible en un signal physique mesurable (Lowe, 2007) (**Figure 3**). Les biocapteurs permettent ainsi de détecter et/ou de quantifier de manière rapide et directe l'analyte cible dans un échantillon complexe. De plus, selon l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), ces outils doivent être petits, compacts, réutilisables et établir une connexion étroite entre le biorécepteur et le transducteur.

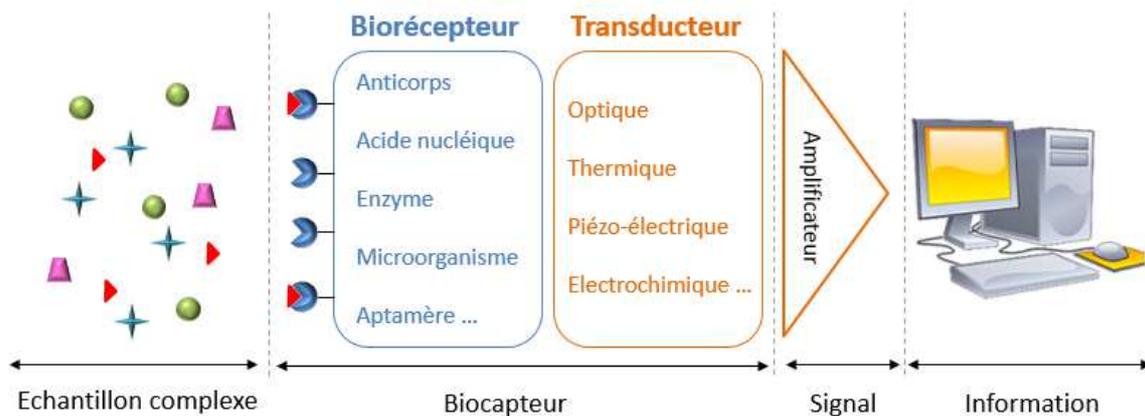


Figure 3 : Principe général du fonctionnement d'un biocapteur.

Le premier biocapteur a été mis au point en 1962 par Leland C. Clark (Clark et Lyons, 1962) afin de mesurer la concentration en glucose sanguin grâce au couplage d'une membrane enzymatique renfermant la glucose oxydase avec une électrode à oxygène. Guilbault et Montalvo ont par la suite développé un biocapteur permettant de déterminer la concentration en urée dans le sang et l'urine (Guilbault et Montalvo, 1969). Depuis les années 1970, des biocapteurs de plus en plus performants ont été développés et sont aujourd'hui utilisés dans divers domaines tels que la médecine, l'agro-alimentaire ou encore le contrôle environnemental (Mehrotra, 2016).

La détection des bactéries pathogènes peut être réalisée en ciblant soit (i) les cellules entières *via* les molécules de surface telles que les antigènes, soit (ii) le contenu intra-cellulaire notamment les acides nucléiques. Dans ce dernier cas, les bactéries subissent une étape de

lyse afin d'extraire les acides nucléiques et de les rendre accessibles, ce qui augmente le temps et le coût de l'analyse mais permet une détection plus spécifique.

II.2. Les biorécepteurs

La nature du biorécepteur influençant fortement la sensibilité et la spécificité de l'outil développé, le choix de cet élément apparaît comme une étape cruciale dans le développement d'un biocapteur (Lowe, 2007). Ainsi, les principales caractéristiques à prendre en compte sont la stabilité du biorécepteur et sa capacité à reconnaître de manière spécifique la molécule cible recherchée. Cette partie décrit les principaux éléments de reconnaissance employés pour la détection des cellules bactériennes entières et de leurs acides nucléiques puis présente les avantages et les inconvénients spécifiques de chacun de ces éléments (Tableau 5).

II.2.1. Les biorécepteurs pour la détection des cellules entières

Les **anticorps**, possédant la capacité de se lier spécifiquement et avec une très grande affinité aux antigènes présents à la surface des bactéries, ont pendant longtemps constitués les éléments de reconnaissance les plus utilisés pour la détection de pathogènes (Byrne *et al.*, 2009). Les biocapteurs utilisant des anticorps sont nommés immunocapteurs.

Les **aptamères**, utilisés pour le développement d'aptacapteurs, sont de courtes séquences d'acides nucléiques (10-100 nucléotides) simples brins présentant une forme tridimensionnelle leur permettant d'interagir de manière spécifique et avec une très haute affinité avec la molécule cible (Figure 4).

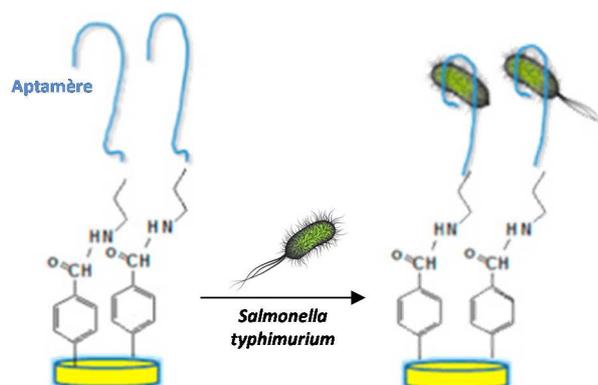


Figure 4 : Principe d'un aptacapteur développé pour la détection de *Salmonella typhimurium* (d'après Bagheryan *et al.*, 2016).

Ces éléments de reconnaissance concurrencent aujourd'hui les anticorps (Mayer, 2009 ; Tombelli *et al.*, 2007). Les aptamères sont isolés grâce à une méthode de sélection *in vitro*, appelée Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX), décrite pour la première fois en 1990 (Ellington et Szostak, 1990 ; Tuerk et Gold, 1990) (**Figure 5**). Dans cette approche, la synthèse chimique aléatoire de molécules d'ADN permet tout d'abord d'obtenir une librairie d'ADN exposée à la molécule cible. Dans le cas de la sélection d'aptamères ARN, la librairie d'ADN est transcrite *in vitro* afin d'obtenir une librairie d'ARN. Les séquences ayant reconnues la molécule cible sont ensuite séparées des autres séquences, par filtration par exemple, et amplifiées par PCR afin d'obtenir une librairie enrichie et de débiter un nouveau cycle. Pour chaque cible, 5 à 15 cycles sont en moyenne nécessaires afin de sélectionner les aptamères retenus comme biorécepteurs (Mascini *et al.*, 2012).

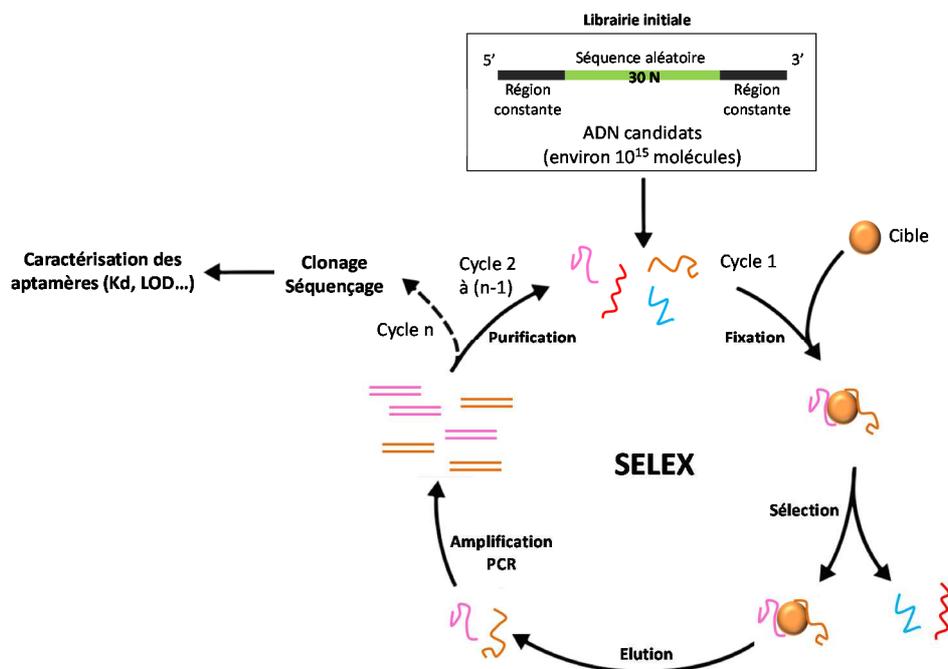


Figure 5 : Principe général du processus de SELEX.

Les **bactériophages** sont des virus spécifiques des bactéries présentant à leur surface des peptides ou protéines leur permettant de se fixer à leur hôte *via* des récepteurs puis de les infecter et d'utiliser leur machinerie cellulaire afin de se répliquer. Cette reconnaissance très spécifique est de plus en plus utilisée dans le développement de biocapteurs que ce soit *via* l'utilisation de phages entiers ou seulement des peptides qu'ils produisent (Schmelcher et Loessner, 2014 ; Balasubramanian *et al.*, 2007 ; Poshtiban *et al.*, 2013). Le processus de sélection des bactériophages commence par la mise en contact de la cible avec une librairie

contenant 10^8 - 10^{10} phages exprimant des peptides ou protéines différentes à leur surface (Smith, 1985 ; Souriau *et al.*, 1998). Les bactériophages fixés à la cible sont élués et amplifiés dans des cellules d'*Escherichia coli* afin de recommencer un nouveau cycle de sélection tandis que les phages n'ayant pas reconnu la cible sont éliminés lors de lavages. En moyenne, 3 à 5 cycles sont nécessaires pour sélectionner des bactériophages possédant une très forte spécificité pour la cible.

L'affinité **lectines / glucides**, un élément clé du mécanisme d'adhésion des bactéries aux cellules hôtes, est aujourd'hui utilisée par certains biocapteurs (Shen *et al.*, 2007 ; Serra *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2013). Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines capables de reconnaître les glucides présents à la surface des bactéries et à l'inverse, les glucides peuvent être utilisés comme biorécepteur pour la reconnaissance des lectines bactériennes.

II.2.2. Les biorécepteurs pour la détection des acides nucléiques

Les biocapteurs basés sur le principe d'hybridation entre des acides nucléiques sont désignés par le terme de génocapteurs. Afin de mettre au point ce genre d'outils, différents types d'éléments peuvent être employés en tant que biorécepteurs.

Les **sondes ADN** sont de courtes séquences d'acides nucléiques (25-40 nucléotides) simples brins de nature synthétique capables de s'hybrider avec des acides nucléiques (ADN et ARN) cibles et ainsi couramment employées pour la détection de bactéries pathogènes (Halford *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Torati *et al.*, 2016).

Afin de pallier les dégradations des sondes ADN par les nucléases, les **acides nucléiques peptidiques** (Peptide Nucleic Acid, PNA), molécules synthétiques analogues de l'ADN, ont été développés (Kerman *et al.*, 2004 ; Prabhakar *et al.*, 2008). Il s'agit de structures au sein desquelles le squelette sucre-phosphate est remplacé par des unités N-(2-aminoethyl)-glycine reliées par des liaisons amides (Nielsen et Egholm, 1999). Le squelette des PNA étant neutre, aucune répulsion électrostatique n'est observée lors de la liaison avec l'ADN, entraînant la formation d'une liaison PNA / ADN plus forte et plus stable que la liaison classique ADN / ADN. L'hybridation PNA / ADN se fait *via* des liaisons hydrogène et obéit aux lois d'appariement des bases (Egholm *et al.*, 1993).

D'autres biocapteurs reposent sur le concept de **balises moléculaires** (molecular beacons) (Kim *et al.*, 2008 ; Kolpashchikov, 2012 ; Stobiecka et Chafupa, 2015). Il s'agit de sondes oligonucléotidiques simples brins composées d'une séquence centrale, complémentaire à la séquence cible, encadrée par des séquences complémentaires entre elles (Tyagi et Kramer, 1996). Une des extrémités est marquée par un fluorophore et l'autre par un « quencher ». En absence de la cible, la sonde adoptant une structure en épingle à cheveux, le « quencher » et le fluorophore se retrouvent à proximité ce qui inhibe la fluorescence par transfert d'énergie de type FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (**Figure 6**). L'ouverture de la sonde, suite à l'hybridation avec la cible, conduit à l'éloignement du « quencher » du fluorophore et par conséquent à l'émission de fluorescence par le fluorophore.

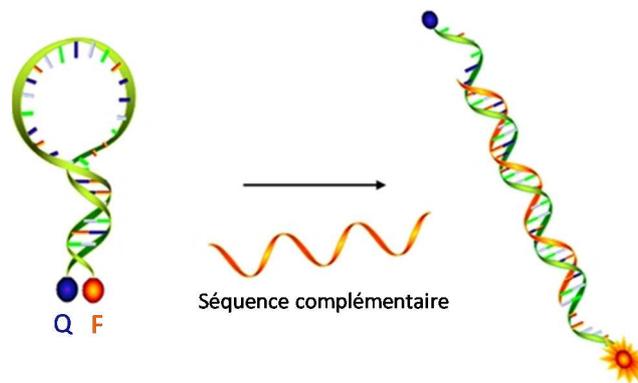


Figure 6 : Principe de fonctionnement des balises moléculaires.
Q : « quencher », F : fluorophore (d'après Kim *et al.*, 2008).

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différents types de biorécepteurs pour la détection de bactéries pathogènes.

Cibles	Biorécepteurs	Avantages	Inconvénients
Cellules entières	Anticorps	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilité des lots • Instabilité • Production nécessitant l'immunisation d'animaux • Coût de production
	Aptamères	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité • Stabilité • Coût • Synthèse <i>in vitro</i> reproductible et fiable • Possibilité de modifications facilitant immobilisation et/ou détection 	<ul style="list-style-type: none"> • Etape de SELEX longue et fastidieuse • Dégradation par des nucléases • Peu commercialisés
	Bactériophages	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Spécificité • Coût • Sélection rapide • Stabilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Immobilisation nécessaire pendant la sélection
	Affinité lectines / glucides	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Stabilité • Peu d'adsorption non spécifique 	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité
Acides nucléiques	Sondes ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité • Spécificité • Possibilité de modifications facilitant immobilisation et/ou détection 	<ul style="list-style-type: none"> • Dégradation par des nucléases
	PNA	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilité • Forte hybridation avec la cible • Détection d'un seul mismatch • Possibilité de modifications facilitant immobilisation et/ou détection 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût
	Balises moléculaires	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Spécificité • Intensité du signal fluorescent 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût

II.3. Les méthodes d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur

Afin de permettre une détection sensible, spécifique et immédiate de la molécule cible, l'immobilisation du biorécepteur à la surface du transducteur est très importante. Elle doit à la fois assurer la stabilité du biorécepteur, son accessibilité pour la cible et l'éventuelle réutilisation du biocapteur. Cette partie décrit les techniques d'immobilisation couramment employées pour l'élaboration de biocapteurs (Liébana et Drago, 2016) (**Figure 7**). Les avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes sont résumés dans le **tableau 6**.

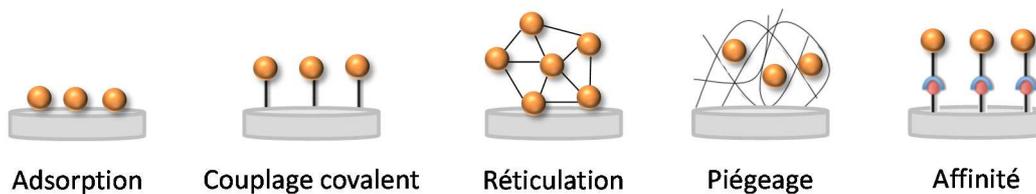


Figure 7 : Principales méthodes d'immobilisation du biorécepteur (orange) à la surface du support.

- L'**adsorption** constitue la technique d'immobilisation la plus simple à mettre en œuvre. Elle est basée sur la formation d'interactions de faible énergie, de type ionique, polaire, hydrophobe ou de liaisons hydrogène entre le biorécepteur et le transducteur.
- Le **couplage covalent** permet d'établir des liaisons covalentes entre des groupements fonctionnels libres du biorécepteur et des groupements fonctionnels à la surface du support. Dans la plupart des cas, le support doit préalablement être fonctionnalisé et activé.
- La **réticulation**, principalement utilisée pour l'immobilisation des enzymes et des anticorps, permet de lier des molécules entre elles grâce à l'utilisation d'un agent réticulant tel que le glutaraldéhyde. Cette technique peut être améliorée en utilisant, une protéine inerte telle que l'albumine de sérum bovin (BSA). Il s'agit alors de co-réticulation permettant une meilleure répartition des molécules.
- Le **piégeage** dans une matrice consiste à incorporer le biorécepteur dans un gel polymérique de nature organique comme l'agarose ou inorganique tel que le sol-gel (Gupta et Chaudhury, 2007) ou l'alcool polyvinylique.

- L'**affinité biologique** entre des biomolécules complémentaires telles que lectines / glucides, anticorps / antigènes et biotine / avidine permet également l'immobilisation de biorécepteurs. Les procédures les plus utilisées reposent sur l'interaction (strept)avidine / biotine et l'utilisation de protéines A ou G pour l'immobilisation des anticorps.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur.

Technique d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Liaison covalente	<ul style="list-style-type: none"> • Importante stabilité • Pas de barrière de diffusion 	<ul style="list-style-type: none"> • Surface fonctionnalisable nécessaire • Conditions de réaction pouvant modifier l'intégrité du biorécepteur
Réticulation	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Stabilité 	<ul style="list-style-type: none"> • Conditions de réaction pouvant modifier l'intégrité du biorécepteur • Accès au biorécepteur limité
Piégeage	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Rapidité • Protection du biorécepteur 	<ul style="list-style-type: none"> • Relargage au travers des pores de la matrice • Accès au biorécepteur limité
Adsorption	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Rapidité • Coût • Immobilisation directe 	<ul style="list-style-type: none"> • Désorption par changement du pH ou de la force ionique • Faible reproductibilité • Orientation aléatoire du biorécepteur
Affinité biologique	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Immobilisation contrôlée et orientée • Spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût • Sensibilité aux variations de température et de pH

II.4. Les méthodes de transduction

Le transducteur, élément physique du biocapteur, permet la transformation du signal issu de la reconnaissance entre le biorécepteur et la cible en un signal mesurable. L'efficacité de transduction va déterminer différentes caractéristiques analytiques du biocapteur telles que la stabilité du signal, la reproductibilité des mesures ou encore la limite de détection. Le choix du transducteur dépend principalement du type de réaction mis en jeu. Le **tableau 7**, situé à la fin de cette partie, récapitule les avantages et inconvénients des principaux types de transducteurs employés pour la détection des bactéries pathogènes.

II.4.1. La transduction optique

Les biocapteurs à transduction optique, largement employés pour la détection de bactéries pathogènes, exploitent les modifications de propriétés optiques induites par la fixation de la cible sur le biorécepteur (Damborsky *et al.*, 2016 ; Yoo et Lee, 2016). Deux grandes catégories de biocapteurs à détection optique se distinguent : ceux utilisant un marquage, avec une enzyme ou un fluorophore par exemple, afin de générer le signal et ceux n'en nécessitant pas.

- Les biocapteurs les plus simples reposent sur des mesures d'**absorbance**, de **fluorescence** ou de **chimiluminescence**. Ces outils dérivent des immuno-essais de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilisant des anticorps de capture, immobilisés au fond des puits d'une microplaque, reconnaissant la molécule cible et des anticorps secondaires marqués permettant de générer un signal. Afin de pouvoir développer des outils portables, directement utilisables sur le terrain, l'utilisation de fibres optiques est aujourd'hui préférée à celle de microplaques (Hayman, 2008). Les modifications d'absorbance, chimiluminescence ou fluorescence induite par la reconnaissance biorécepteur/cible sont transmises aux fibres optiques transportant le signal jusqu'au détecteur. Cependant, l'utilisation d'un marquage rendant l'analyse longue et coûteuse, d'autres biocapteurs basés sur la résonance plasmonique de surface ou la spectroscopie Raman, ont été développés afin de permettre une détection directe des pathogènes.
- Les biocapteurs à **résonance plasmonique de surface** (SPR) utilisent le principe de l'onde évanescente (Wang *et al.*, 2013 ; Baccar *et al.*, 2010 ; Dudak et Bayaci, 2009 ; Bergwerff, 2006). Lorsqu'un faisceau illumine l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière est réfléchie, l'autre est réfractée mais selon l'angle d'incidence, la lumière peut être totalement réfléchie. En absence de réfraction, une perturbation électromagnétique, appelée onde évanescente, est générée au niveau de l'interface entre les deux milieux et se propage perpendiculairement à la surface de l'interface (Nguyen *et al.*, 2015 ; Wijaya *et al.*, 2011). Les électrons à la surface d'une fine couche de métal sont excités par l'onde évanescente. L'intensité du faisceau réfléchi diminue avec un angle défini, l'angle de

résonance dont la variation est proportionnelle à la concentration en cible dans l'échantillon analysé (**Figure 8**).

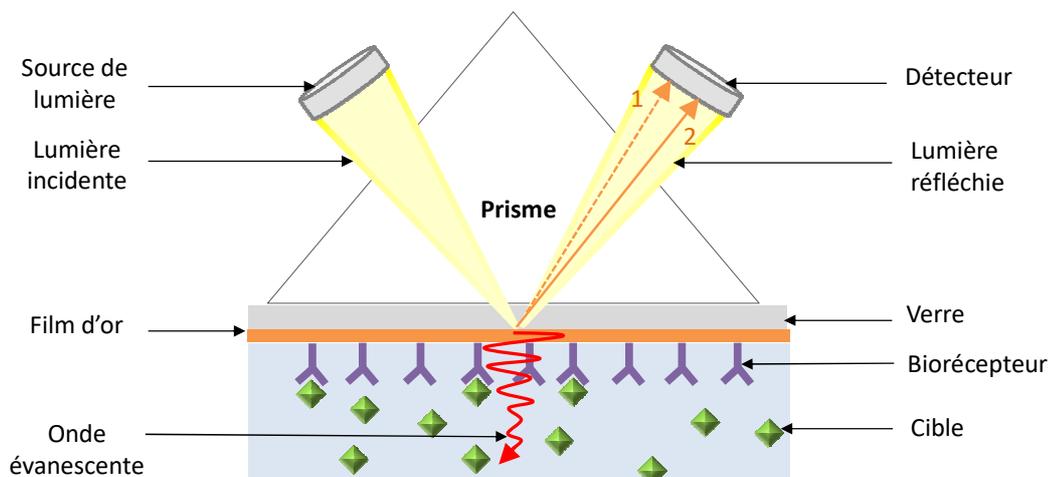


Figure 8 : Principe de fonctionnement d'un dispositif SPR. La fixation de la cible sur le biorécepteur entraîne le décalage de l'angle de résonance de la position 1 vers la position 2.

- La **spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS)** constitue une autre technique de transduction permettant la détection directe de pathogènes (Wu *et al.*, 2013 ; Kotanen *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2017). La spectroscopie Raman classique consiste à illuminer un échantillon avec une lumière monochromatique de type laser et à étudier la lumière diffusée. Après interaction avec l'échantillon, la plupart des radiations diffusées possèdent une fréquence égale à celle de la radiation incidente, il s'agit dans ce cas de diffusion de Rayleigh. Cependant, une faible proportion de ces radiations présente une fréquence différente de celle du faisceau incident et on parle alors de diffusion Raman. Dans le cas de la spectroscopie Raman exaltée de surface, cet effet Raman est amplifié grâce à l'adsorption des molécules à analyser à la surface de nanostructures métalliques (Bantz *et al.*, 2011 ; Bumbrah et Sharma, 2016 ; Kahraman *et al.*, 2017).

II.4.2. La transduction mécanique

Les biocapteurs mécaniques permettent la détection directe, sans utilisation de marquage, de changements de masse à la surface du transducteur suite à la fixation de la cible. La détection des pathogènes fait intervenir deux grandes catégories de transducteurs mécaniques (Gao et Liu, 2013 ; Saad et Zaaba, 2014 ; Buchapudi *et al.*, 2011) :

- La **microbalance à quartz** utilise la capacité du cristal de quartz à osciller lorsqu'il est immergé dans un milieu liquide et qu'il est soumis à un stimulus électrique. La fixation de la cible sur le biorécepteur immobilisé à la surface du cristal de quartz induit un changement de masse conduisant à la modification de la fréquence d'oscillation du cristal (Vashist et Vashist, 2011 ; Montagut *et al.*, 2011).
- Les **microleviers** (microcantilevers), microstructures en forme de poutre ancrées par une seule de leur extrémité à un support, peuvent fonctionner selon deux modes différents (Fritz, 2008 ; Tamayo *et al.*, 2012) (**Figure 9**). Dans le cas du mode statique, la fixation de la cible entraîne une augmentation de masse conduisant à une déflexion du levier, notée (ΔZ), mesurable. Dans le cas du mode dynamique, la poutre oscille à une certaine fréquence qui est modifiée suite à la liaison de la cible.

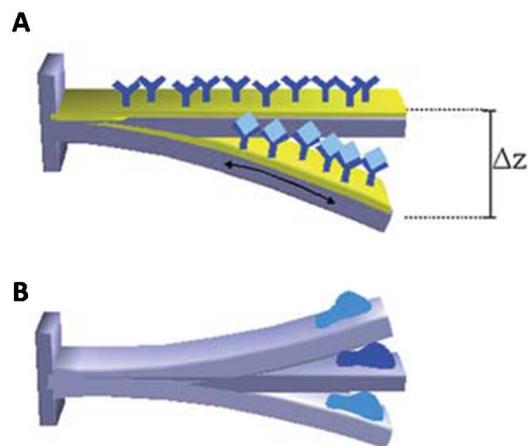


Figure 9 : Représentation schématique d'un microlevier en mode de fonctionnement (A) statique où ΔZ correspond à la déflexion du levier et (B) dynamique (d'après Alvarez et Lechuga, 2010).

II.4.3. La transduction électrochimique

La transduction électrochimique constitue l'une des méthodes les plus employées pour la détection des pathogènes (Palchetti et Mascini, 2008 ; Zelada-Guillén *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012 ; Brosel-Oliu *et al.*, 2015).

Les biocapteurs électrochimiques permettent de convertir les réactions biochimiques issues de la reconnaissance entre le biorécepteur et la molécule cible en un signal électrique (Pohanka et Skládal, 2008 ; Hammond *et al.*, 2016). Une cellule électrochimique comprend typiquement trois électrodes : l'électrode de travail sur laquelle sont immobilisés les biorécepteurs, l'électrode de référence de potentiel connu et l'électrode auxiliaire employée afin de permettre le passage du courant dans le système et ainsi minimiser celui passant par l'électrode de référence.

Selon le mode de transduction, les biocapteurs électrochimiques sont classés en 3 grandes catégories définies ci-dessous.

- **L'ampérométrie** mesure, à un potentiel donné, les changements d'intensité du courant. Pour cela, il est nécessaire que les biorécepteurs consomment ou produisent une espèce électroactive. Ainsi, les biocapteurs ampérométriques utilisent généralement des enzymes rédox ou des biomolécules marquées par un composé électroactif ou une enzyme rédox (Sadeghi, 2013). L'intensité du signal électrique étant proportionnel à la concentration en espèces électroactives oxydées ou réduites à la surface de l'électrode de travail, il est possible de déterminer la concentration en cible dans l'échantillon analysé.

Il existe actuellement 3 générations de biocapteurs ampérométriques. Dans le cas de la première génération, l'espèce enzymatiquement générée est directement oxydée ou réduite à la surface de l'électrode. Afin de limiter les phénomènes d'interférences liés à l'application de potentiels de travail élevés, une seconde génération de biocapteurs a été développée. Elle utilise des médiateurs rédox tels que le ferrocène et les quinones, afin de faciliter le transfert des électrons entre l'électrode et le centre rédox de l'enzyme ou un des produits issus de la réaction enzymatique. Enfin, la troisième génération est basée sur le transfert direct des électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode.

- **La potentiométrie** est une technique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (Koncki, 2007). Le signal mesuré est proportionnel au logarithme de la concentration en cible dans l'échantillon selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln C$$

Avec E : potentiel du couple rédox en volts ; E_0 : potentiel standard du couple rédox en volts ; R : constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; T : température absolue en Kelvin ; n : nombre d'électrons échangés ; F : constante de Faraday ($9,65.10^4 \text{ C.mol}^{-1}$) et C : concentration de la cible en mol.L^{-1} .

Les biocapteurs potentiométriques sont généralement utilisés afin de mesurer des variations de pH ou de concentrations ioniques.

- **L'impédance**, basée sur le principe de la spectroscopie d'impédance électrochimique, consiste à appliquer un signal sinusoïdal de faible amplitude entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (Bahadır et Sezgintürk, 2016). Cela permet de mesurer l'impédance du système correspondant au rapport entre la tension appliquée et l'intensité du courant mesuré. Les modifications d'impédance suite à la fixation de la cible sur le biorécepteur permettent une détection directe, sans marquage préalable (fluorophore, enzyme rédox) de la cible.

Les biocapteurs impédancemétriques peuvent être employés selon deux modes :

- Le mode non faradique n'implique aucun transfert d'électrons. La fixation de la cible sur le biorécepteur modifie les propriétés électriques et/ou diélectriques de l'électrode et par conséquent entraîne une variation de l'impédance mesurée.
- Dans le cas du mode faradique, une sonde électroactive telles que $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ est employée. La sonde diffuse à travers le système pour venir réagir à la surface de l'électrode. L'impédance permet de mesurer la résistance de transfert de charge liée à la réaction d'oxydation ou de réduction se produisant à l'électrode. La fixation de la cible sur le biorécepteur rendant la diffusion de la sonde plus difficile, une augmentation de la résistance du système est alors observée. Ce second mode est plus sensible et ainsi plus utilisé que le mode non faradique.

Tableau 7 : Avantages et inconvénients des principaux types de transducteurs employés pour la détection de bactéries.

Type de transduction	Avantages	Inconvénients	
Transduction optique	Colorimétrie	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Rapidité • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Manque de sensibilité • Marquage nécessaire
	Fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Sélectivité • Rapidité 	<ul style="list-style-type: none"> • Marquage nécessaire • Pas de mesure en temps réel
	Chimiluminescence	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Rapidité 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût • Durée de vie du signal courte
	SPR	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Spécificité • Simplicité • Pas de marquage 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipements onéreux
	SERS	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Simplicité • Rapidité • Faible quantité d'échantillon nécessaire • Pas de marquage 	<ul style="list-style-type: none"> • Signal parfois masqué par fluorescence • Répétabilité
Transduction mécanique	QCM	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Simplicité • Rapidité • Pas de marquage 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation limitée en milieu liquide • Sensible aux vibrations parasites extérieures
	Microcantilever	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Simplicité • Rapidité • Pas de marquage 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilisation limitée en milieu liquide • Sensible aux vibrations parasites extérieures
Transduction électrochimique	Ampérométrie	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Simplicité • Miniaturisation possible • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Marquage de l'analyte pour augmenter la réaction électrochimique
	Potentiométrie	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Automatisation possible • Miniaturisation possible • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Manque de spécificité • Possible dérive du signal • Moins sensible et rapide que l'ampérométrie
	Conductimétrie	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicité • Miniaturisation possible • Biocompatibilité avec l'échantillon biologique • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Manque de spécificité • Moins sensible que l'ampérométrie et la potentiométrie
	Impédance	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité • Rapidité • Simplicité • Pas de marquage • Coût 	<ul style="list-style-type: none"> • Manque de reproductibilité

II.5. Les biocapteurs développés pour l'analyse des bactéries pathogènes

Comme nous l'avons vu précédemment (II.2.), les biocapteurs appliqués à la détection des bactéries pathogènes peuvent être subdivisés en deux grandes catégories selon qu'ils ciblent les cellules entières ou les acides nucléiques. L'étude des bactéries reposait initialement sur la détection de cellules entières *via* l'utilisation d'immunocapteurs, aujourd'hui concurrencés par les aptacapteurs (Hamula *et al.*, 2011). De plus en plus de biocapteurs ciblent désormais les acides nucléiques afin de permettre une meilleure spécificité et de pouvoir étudier uniquement la fraction active des bactéries *via* la détection de l'ARN. Dans les deux cas, les techniques de transduction optique et électrochimique dominent (Connelly et Baeumner, 2012 ; Nayak *et al.*, 2009). Il est important de noter que la détection par impédance est de plus en plus appliquée à la détection des bactéries (Ahmed *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2012).

Depuis une vingtaine d'années, d'importantes améliorations de la sensibilité et de la spécificité des biocapteurs ont été constatées. Les progrès réalisés dans le domaine des nanotechnologies ont nettement contribué à l'amélioration des performances des biocapteurs notamment en permettant d'aller vers une miniaturisation des outils développés, en proposant de nouvelles techniques pour l'immobilisation des biorécepteurs ou pour l'amplification du signal généré par la bio-reconnaissance. Parmi les nanomatériaux les plus utilisés dans le cadre de la détection de bactéries pathogènes, les nanoparticules magnétiques permettent de concentrer la cible avant détection. Des nanoparticules préalablement fonctionnalisées à l'aide d'anticorps ou d'ADN spécifiques du pathogène recherché sont simplement ajoutées à l'échantillon à analyser puis, après interaction avec la cible, elles sont récupérées à l'aide d'un aimant, permettant ainsi de séparer la cible des autres constituants (Li *et al.*, 2011 ; Chan *et al.*, 2013 ; Kuang *et al.*, 2013). Des nanoparticules semi-conductrices appelées « quantum dots » peuvent non seulement être utilisées en tant que marqueur grâce à leurs propriétés de fluorescence unique mais permettent également d'augmenter la surface d'immobilisation des biorécepteurs (Wang *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2015). Enfin, les nanoparticules d'or, l'oxyde de graphène, les nanotubes de carbone et les nanotiges de carbone sont également couramment employés pour le développement de biocapteurs en raison de leur large surface spécifique et de leur haute conductivité électrique. Tout d'abord, ces matériaux augmentent la surface disponible pour l'immobilisation des biorécepteurs et donc la densité de greffage. De plus, ils favorisent les transferts d'électrons conduisant à une

amplification du signal généré et diminuent le rapport signal/bruit de fond (Li *et al.*, 2010 ; Jung *et al.*, 2010 ; Parab *et al.*, 2010 ; Jain *et al.*, 2012 ; Thuy *et al.*, 2012).

III. Application des biocapteurs et des méthodes de diagnostic rapide dérivées à la détection du genre *Vibrio*

- ARTICLE 1. BIOSENSING PLATFORMS FOR *VIBRIO* BACTERIA DETECTION : A REVIEW

E. Da-Silva, J. Baudart et L. Barthelmebs

A soumettre, Talanta

Dans cette partie, un état de l'art des outils analytiques de diagnostic rapide pour le suivi des bactéries du genre *Vibrio* est présenté. La bibliographie réalisée a mis en évidence le développement majoritaire de biocapteurs, et de tests en bandelettes. Les spécificités et caractéristiques analytiques de chacun de ces outils sont détaillées, tout en insistant sur les étapes de préparation des échantillons et les méthodes d'extraction des acides nucléiques employées. En vue de son intégration au sein d'une revue, cette partie est présentée en anglais.

Biosensing platforms for *Vibrio* bacteria detection : a review

E. Da-Silva^{1,2*}, J. Baudart² and L. Barthelmebs^{1,2}

¹ Université Perpignan Via Domitia, Laboratoire Biocapteurs Analyses Environnement, Perpignan, France

² Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, Observatoire Océanologique, Banyuls/Mer, France

***Corresponding author :**

E. Da-Silva, Université Perpignan Via Domitia, Laboratoire Biocapteurs Analyses Environnement, F-66860 Perpignan, France.

E-mail : elise.dasilva@etudiant.univ-perp.fr

Highlights:

- *Vibrio* prevalence is currently increasing in the world.
- Biosensing platforms constitute interesting alternative techniques for *Vibrio* detection.
- This paper reviews strip test, optical and electrochemical biosensor devices developed for *Vibrio* spp. detection.
- Sample preparation techniques have been described.

Abstract:

Vibrio related illnesses are increasing worldwide in humans and marine animals. The detection of these bacteria is still mainly performed using traditional microbiological methods based on culture grown on differential agar media which are labor intensive, time consuming and unsuitable for in-field and high-throughput analysis. To overcome these limitations, biosensing platforms have emerged as promising alternative tools for rapid, sensitive, and real-time detection of *Vibrio* species in clinical, food and environmental samples. In this review, we will focus on strip test devices, and on optical and electrochemical biosensors developed for *Vibrio* analysis. Particular attention is given to sample preparation techniques.

Keywords : *Vibrio* detection ; strip tests ; optical biosensors ; electrochemical biosensors ; sample preparation.

Introduction

Due to the increased prevalence of well-known pathogens and the emergence of novel pathogenic microorganisms in aquatic sources, global incidence of water-borne diseases is currently rising. This phenomenon results from a combination of complex human factors including inadequate water supply, sanitation, and hygiene issues as well as the intensification of continental run-off discharging pathogens into coastal waters. Environmental factors such as climate changes and extreme weather events could also induce the persistence of pathogens in water sources [1].

Among emerging and reemerging infectious agents, *Vibrio* bacteria are widely distributed in coastal and estuarine environments where they are found as free-living cells and also closely associated with marine animals, plankton, algae or abiotic surfaces [2].

At least twelve *Vibrio* species, including *V. cholerae* O1 and O139 serogroups, responsible for cholera outbreaks, and *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* involved in seafood-borne infections, have been described as human pathogens. Cholera disease remains a major threat to public health, especially in countries without improved sanitation facilities. According to the World Health Organization [3], 1.3 to 4.0 million cholera cases, leading to 21 000 to 143 000 deaths, occur each year in the world. However, the global impact is still largely underestimated because the majority of cases is not reported [4]. Furthermore, in the last decades, an increase in human *Vibrio* infections has been observed worldwide, mainly in Africa and in Asia, but also in USA [5]. As an example, the number of vibriosis excluding *V. cholerae* O1 and O139 serogroups, had regularly increased between 2007 and 2014 from 549 to 1252 in this country. The most frequently reported species during this seven-year analysis was *V. parahaemolyticus*, isolated from 39 to 51% of patients, followed by *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* isolated from 16 to 19% and 10 to 14% of the patients, respectively.

Several pathogenic *Vibrio* species are also involved in mass mortalities of marine animals, leading to important economic losses in aquaculture. This is well illustrated by *V. anguillarum* and *V. salmonicida*, two major pathogens involved in outbreaks in eel and salmon, respectively [6], by *V. splendidus* and *V. aestuarianus* associated with summer mortality events affecting oyster farming in Europe [7], and by *V. harveyi* and *V. nigripulchritudo*, the main infectious agents of farmed shrimps [8,9].

Traditionally, *Vibrio* detection in clinical, food and environmental samples is assessed by microbiological methods based on culture grown on differential agar media followed by colony counting and phenotypic identification of isolated strains. However, these approaches suffer from inherent and well-known drawbacks since they are time-consuming and require a delay of up to a week for species identification. Furthermore, it has been shown that vibrios are able to modify their metabolic and enzymatic activities in response to environmental changes, inducing phenotypic and biochemical variabilities, and leading to a low efficiency of these approaches for an accurate identification [10,11]. Culture-based methods also fail to detect cells induced, by environmental stresses, to enter a viable but-non culturable (VBNC) state [12,13,14,15,16].

It appears that the surveillance programs suffer from a lack of rapid and sensitive tools to detect pathogenic *Vibrio* strains in various matrix samples. In order to ensure relevant diagnosis, alternative methods to cultural ones have to meet several criteria. Ideally, they must be accurate and reliable, rapid and low cost, automated or integrated into systems to provide high-throughput analysis. They should also be suitable for a broad range of applications and offer simultaneous detection of multiple targets.

During the last decades, biosensing platforms, mainly represented by biosensors, have been proposed as attractive and effective alternatives to detect microorganisms for clinical diagnosis, food analysis and environmental monitoring [17,18,19].

Biosensors are analytical devices typically comprising (i) a bioreceptor (i.e., antibodies, aptamers, DNA probes) which correspond to the biological recognition element able to detect the target analyte and (ii) a transducer (i.e., optical, electrochemical, mechanical) that converts the biochemical reaction induced by the bio-recognition event into a measurable signal (**Figure 1**). Compared to current diagnostic methods, biosensors offer several advantages since they are highly sensitive, low-cost, easy-to-use and could allow real-time analysis. Optical and electrochemical transduction techniques have been prominently applied for *Vibrio* detection. Optical biosensors include a large number of subclasses based on absorption, reflection, refraction, dispersion, infrared, chemiluminescence, and fluorescence. These devices provide advantages of compactness, flexibility, and resistance to electrical noise. Electrochemical biosensors can be classified into amperometric/voltammetric, potentiometric, impedimetric and conductimetric, based on their observed parameters such

as current, potential, impedance and conductance, respectively. They are fast, easy to use, cheap, small-sized and easily miniaturized.

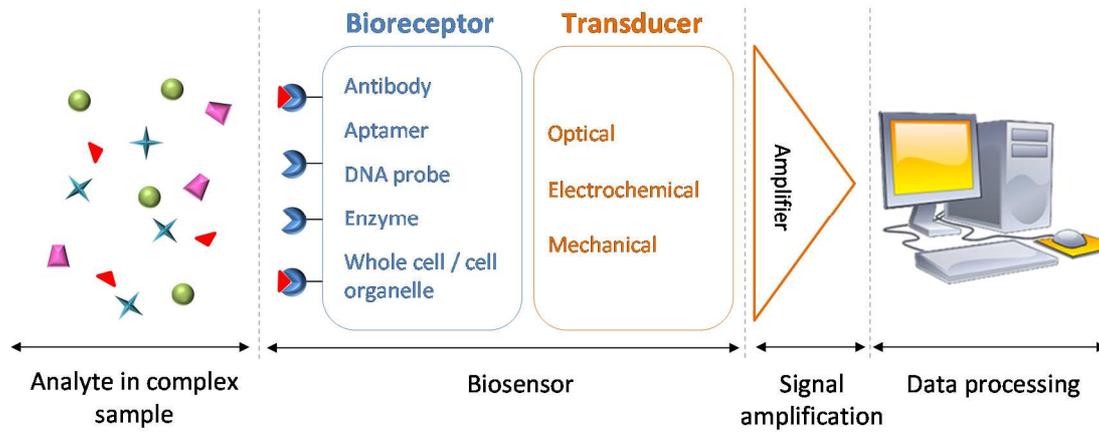


Figure 1 : General principle of biosensor devices.

More recently, the use of paper-based platforms, especially strip tests have also been intensively reported for *Vibrio* analysis. These devices are based on the analyte migration, under capillary action, through different zones of a membrane, on which bioreceptors (i.e., antibodies, aptamers, DNA probes) are immobilized. The analyte recognition leads to a response on the test line that can be assessed by eye or using a reader. A response on the control line validates the proper migration of the sample through the membrane (**Figure 2**). Strip tests don't require laboratory infrastructure or technical expertise and thus, constitute interesting screening tools for a rapid analysis that can be performed at the point of care.

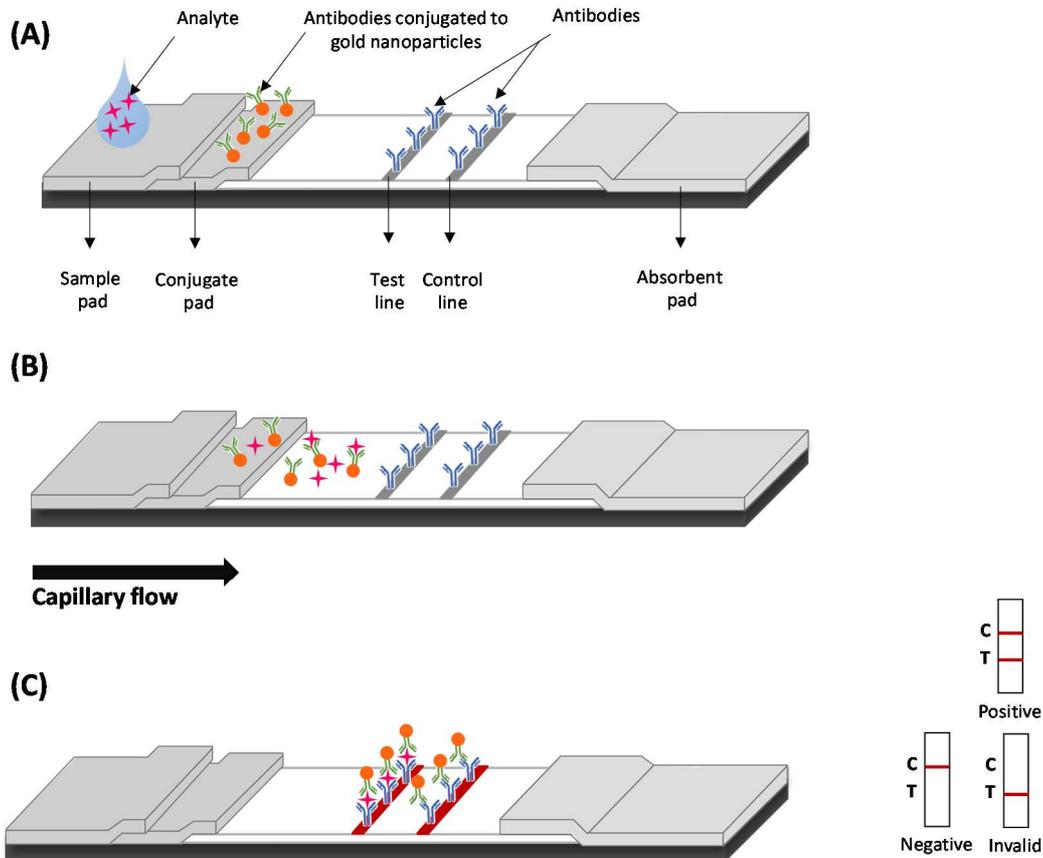


Figure 2 : Lateral flow strip test principle. **(A)** The sample is loaded on the sample pad ; **(B)** The antibodies conjugated to gold nanoparticles bind to the analyte ; **(C)** The analyte recognition leads to a response on the test line and the proper migration of the sample through the membrane is validated by a response on the control line.

Thus, the purpose of this review is to examine the current status of biosensing platforms for *Vibrio* bacteria detection. In order to allow bacteria sensing, two main strategies can be considered: the direct detection of whole bacterial cells or the detection of specific nucleic acid targets after the bacterial lysis. For each of these strategies, strip tests, and biosensors either optical or electrochemical, targeting *Vibrio* are presented. A special emphasis is placed on sample preparation techniques used prior analysis. Further, current trends, advantages and disadvantages and future prospects of these methods are discussed.

Samples preparation before analysis

Due to their influence on the sensitivity of the analytical methods for bacteria determination, techniques applied to sample preparation are of great importance.

Depending on the bioreceptor, biosensors and strip tests designed for bacteria analysis are able to detect either whole cells, using antibodies or aptamers, or nucleic acids, using complementary DNA sequences as probes. Furthermore, these tools are, in principle, dedicated to real sample analysis. Thus, sample preparation has to be adapted not only to the type of biosensor but also to the kind of sample. In the case of *Vibrio* monitoring, commonly analyzed matrices are food (shrimps, oysters, mussels, clams), clinical (stool and blood), and environmental samples (seawater, ground water, tap water). Since these complex matrices could contain some compounds interfering with the response signal, such as fats, polysaccharides, proteins, minerals and even some antimicrobial preservatives, a preliminary treatment step is generally needed prior analysis. Besides, *Vibrio* cells are usually present at low levels in environmental samples such as water, requiring the use of concentration techniques to allow their detection and avoid false negative results. The different sample preparation methods reported in the literature for *Vibrio* analysis by biosensor and strip test technologies are detailed below.

Whole cell preparation

To validate the biosensing tools targeting whole cells, *Vibrio* strains are cultivated in an appropriate medium, the cells are then harvested by centrifugation, washed and resuspended at different concentrations in saline buffer or nutritive medium. The obtained suspensions are then directly used for analysis [20,21,22,23,24,25] or added to real samples, often pretreated, to evaluate their matrix effect. Liquid samples, such as water, are usually sterilized by a filtration through 0.2 or 0.45 μm pore size membranes [23,24]. For solid samples, such as seafood, a well-defined mass of product is mixed and homogenized in buffer or in alkaline peptone water (APW) [21,26]. A filtration step can be added to remove the large debris [24,27,28].

Similar protocols are applied to *Vibrio* cells from naturally contaminated samples, which are, in most of cases, stools from patients presenting cholera symptoms. After a simple dilution step in appropriate buffer, liquid stool samples are usually directly analyzed [29,30,31,32,33,34]. A pre-enrichment step can also be carried out in APW for 4 to 6h at an appropriate growth temperature to increase the bacterial biomass [34,35,36]. In order to determine the concentration of cells, and/or to check the presence of *Vibrio* in samples, culturable cells are always enumerated in parallel by classical culture-based methods.

Nucleic acid preparation

Nucleic acid extraction is a critical step to obtain a positive signal in biosensor analysis. The selected method must allow to obtain pure and concentrated nucleic acid extracts. Among the numerous methods available for this purpose, the boiling lysis method is mainly used for DNA extraction from pure culture [37,38,39,40]. Cells are boiled for 10 min in saline solution, the lysate is centrifuged and the released DNA is recovered from the supernatant. Commercial DNA extraction kits such as QIAamp® DNA minikit from Qiagen, and Nucleospin® Tissue from Macherey-Nagel, are also used to extract and purify DNA from pure cultures in 30 to 45 minutes with a high-throughput [41,42,43].

In the case of nucleic acids extraction from real samples, the boiling lysis method can also be applied [44,45,46], with slight modifications such as the addition of a chemical lysis before boiling for shrimp and oyster samples[41,42,47,48]. Nucleic acids can also be extracted using the phenol chloroform method, in order to complex and eliminate polysaccharides from the samples [49,50]. Nevertheless, this method is laborious and uses toxic compounds. As a good alternative to those methods, several companies have developed kits to decrease extraction time and to obtain nucleic acids without inhibitors. Surprisingly, no publication concerning *Vibrio* detection using biosensing platforms has reported the use of such kits.

Recently, an automated method was reported for DNA extraction from pure cultures and spiked tap water samples. This step is incorporated into a rotary microfluidic system, using glass microbeads as solid phase matrix allowing a strong DNA adsorption in presence of chaotropic salts [51].

After DNA extraction, quantification of the extracted nucleic acids is rarely performed since the majority of the assays used an amplification step of DNA by PCR before analysis. The obtained PCR products are often subjected to gel electrophoresis for quality checking [37,38] and their concentration is measured by spectrophotometry at 260 nm [43]. The double-stranded PCR products can be denatured by a heating step at 95°C during few minutes, sometimes followed by a cooling step on ice to obtain single stranded-DNA (ssDNA) for the hybridization reaction with DNA probes [44]. An asymmetric PCR, or a linear after the exponential PCR (LATE-PCR), can also be applied to directly generate ssDNA amplicons [38,41,44,52].

Interestingly, in some recent reports, direct nucleic acid detection was performed without any amplification step by PCR. Nucleic acid concentration, purity and integrity were assessed using either Nanodrop spectrophotometer [53,54,55], Eppendorf Biophotometer [56], or Agilent 2100 Bioanalyzer [50]. Prior to biosensor analysis, a pretreatment step was nevertheless needed to improve the recognition between probes and targets. For DNA samples, a denaturation step at 92°C for few minutes immediately followed by an ice cooling was proposed [56]. The heating step could also be combined with an ultrasonication fragmentation [53,54]. For RNA samples, a chemical fragmentation step was applied [50].

Biosensing platforms for the detection of whole bacterial cells

One of the most important factors in the set-up of biosensing platforms for whole bacterial cells is to define a suitable targeted molecule linked to the bacterial cell surface, such as outer membrane lipopolysaccharide, a virulence factor in pathogenic *Vibrio* species. This targeted molecule is then used to produce specific bioreceptors (i.e., antibodies, aptamers) integrated into biosensing platforms to allow a direct and rapid detection of bacteria with high affinity and specificity.

Strip test devices

The strip tests developed for the detection of whole *Vibrio* cells are summarized in **Table 1**. All these devices are based on a lateral flow immunochromatography assay (LFA) using antibodies as presented in **Figure 2**.

Since cholera mainly affects developing countries with poor resources and limited access to laboratory facilities, strip test devices appear as interesting tools to detect this disease. Thus, numerous strip tests have been developed for the detection of *V. cholerae* species in stool samples (**Table 1**). The most widely used is the Pasteur Institut dipstick, nowadays commercially available as Crystal VC® RDT (Span Diagnostics Ltd., India), able to detect the lipopolysaccharide (LPS) antigen of *V. cholerae* O1 and O139 using specific monoclonal antibodies (MAb). Several studies have evaluated the performances of both the prototype and the commercial version. Most of these studies used culture on solid medium as reference method. Sensitivity and specificity correspond to the proportion of positive strip tests among patients positive by a reference method, and negative strip tests among reference method negative patients, respectively. A first evaluation on frozen stool samples showed high

sensitivity and specificity ranging from 94.2 to 100% and from 84 to 100%, respectively [57]. These observations were in accordance with the results obtained for rectal swab analysis with sensitivity and specificity ranging from 93-96% and 92-98%, respectively [35]. However, two studies performed on bulk stools during cholera outbreaks showed lower specificities ranging from 71% to 77% and from 77% to 97% [30,58]. In order to increase the sensitivity of the assay and to obtain performances similar to that of culture [36], an enrichment of samples in APW was often performed prior analysis. Recent studies have shown that a 24h enrichment step in APW significantly increased the sensitivity compared to a direct testing [59] whereas after 6h of enrichment, the sensitivity was only marginally increased [34]. The importance of the reference method was also underlined by several reports [31,33] since a significant increase in the assay specificity was observed when both culture and PCR were used as references. Some authors have also highlighted the impact of the technician skill level on the test specificity [29,60] that can vary, for example, from 67% when the assay was performed by field paramedics to 76% when the users were lab technicians [29].

Strip test devices were also proposed for the rapid and specific detection of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa [61]. The test was based on a LFA using MAb highly specific to the Ogawa serotype and colloidal gold particles-antibodies conjugated. The limit of detection (LOD) of the developed device was 10^4 CFU mL⁻¹ and showed 100% sensitivity and selectivity compared to standard culture method. Others LFAs, were developed for the detection of *V. cholerae* O139 alone. These tools showed sensitivities ranging from 10^6 [20] to 10^4 CFU mL⁻¹ [21] and were highly specific. Although strip tests can be used for early detection of cholera, all those studies reveal some limitations since the tools can fail to detect *V. cholerae* leading to false negative results [31,32,57].

More recently, two similar assays have been described for the detection of other *Vibrio* species. The first one, targeting *V. parahaemolyticus*, showed a LOD of 1.2×10^3 CFU mL⁻¹ using pure cultures and no cross reaction within a panel of 32 species [25]. Furthermore, when performed on hepatopancreas and fecal samples from shrimp, and on human fecal samples, the assay demonstrated 100% sensitivity and specificity. In the second one, specifically designed for *V. anguillarum* detection, the sensitivity of the assay was increased using upconversion fluorescent materials, able to convert near infrared light into visible light, instead of standard gold nanoparticles reporters [22]. This assay demonstrated a LOD of 10^2 CFU mL⁻¹ and no cross-reaction with 8 other pathogenic species (*V. alginolyticus*, *V. harveyi*,

Table 1 : Characteristics of the strip tests developed for whole *Vibrio* cell detection. nd : not determined.

Target	Principle	Bioreceptor	Reference method	Sensitivity	Specificity	Evaluation of real samples	Assay time	Reference
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of frozen stool or stool on filter paper	94.2%-100%	84-100%	Frozen stools and rapid culture (6h) of stools collected on filter paper	10 min	[57]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture on rectal swabs (multiplex PCR when RDT + / culture -)	93-96%	92-98%	Rectal swabs with 4h enrichment in APW	10 min	[35]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	PCR on rectal swabs	97%	71-76%	Fresh, bulk stools	10 min	[30]
<i>V. cholerae</i> O1	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of rectal swabs and bulk stools	93-97%	77-97%	Rectal swabs with 4h enrichment in APW and fresh and bulk stools	10 min	[58]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	PCR on wet filters inoculated with stool samples and wet filter paper surnageants	86.1%	100%	Stool samples with 4-6h enrichment in APW	15 min	[36]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of water samples	89%	100%	Spiked water samples with 6-24h enrichment in APW	nd	[59]
<i>V. cholerae</i> O1	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of watery stools	65.6-75%	91.8-98.4%	Watery stool samples with/without 6h enrichment in APW	15 min	[34]
<i>V. cholerae</i> O1	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of rectal swabs	93%	49%	Fresh, bulk stools	15-20 min	[60]
<i>V. cholerae</i> O1	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of bulk stools	93-94%	67-76%	Fresh, bulk stools	nd	[29]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture of bulk stools	92%	73%	Fresh, bulk stools	~ 10 min	[31]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture and PCR on stool samples	88.2-92.9%	60.4-88.6%	Stools	15 min	[33]
<i>V. cholerae</i> O1 serotype Ogawa	LFA	Antibody	Culture on diarrhea feces	10 ⁴ CFU mL ⁻¹	100%	Diarrhea patients feces	5 min	[61]
<i>V. cholerae</i> O139	LFA	Antibody	nd	10 ⁶ CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Rectal swab specimens and specimens of enriched APW	5 min	[20]
<i>V. cholerae</i> O139	LFA	Antibody	nd	10 ⁴ CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Blood clams, mussels, oysters and shrimp spiked samples	20 min	[21]
<i>V. cholerae</i> O1/O139	LFA (Crystal VC® RDT)	Antibody	Culture and RT-PCR on stool samples	nd	nd	Watery spiked stool samples	10 min	[32]
<i>V. parahaemolyticus</i>	LFA	Antibody	Culture on shrimp hepatopancreas and fecal human samples	1.2 x 10 ³ CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Shrimp and diarrheal stool samples	5 min	[25]
<i>V. anguillarum</i>	LFA	Antibody	nd	10 ² CFU mL ⁻¹	No cross reaction	nd	15 min	[22]

LFA : lateral flow assay.

V. parahaemolyticus, *V. vulnificus*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, and *Staphylococcus aureus*).

Contexte scientifique

Optical biosensors

Comparatively to LFA, few optical immunosensors were proposed for the detection of whole *Vibrio* cells as reported in **Table 2**.

The first optical immunosensor was applied to *V. cholerae* detection and was based on surface plasmon resonance (SPR) detection technique. A detection range of 10^5 - 10^9 cells mL⁻¹ and a LOD of 10^5 cells mL⁻¹ were obtained using monoclonal antibodies against LPS as bioreceptors [62]. An interesting study showed that, by targeting the outer membrane protein OmpW instead of the LPS, linear range and LOD were significantly improved to 10^2 - 10^5 cells mL⁻¹ and 43 cells mL⁻¹, respectively [63].

A multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) immunosensor, using 1-pyrenebutyric acid as a fluorescent reporter system grafted onto the MWCNT, was developed to target *V. alginolyticus* [27]. The fluorescence intensity was correlated with culturable cell concentrations in the range 9.0×10^2 to 1.5×10^6 CFU mL⁻¹ and the LOD was 2.8×10^2 CFU mL⁻¹ when tested with pure bacterial culture. The sensor showed no cross reaction with the 4 other tested bacterial species (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* and *Bacillus subtilis*) and demonstrated recovery rates in the range of 89.4-94% and 95.9-102.3% when tested with shrimp and fishpond water samples, respectively.

A stationary liquid phase lab-on-chip (SLP-LOC) was recently described for *V. parahaemolyticus* detection [26] (**Figure 3**). The device is based on a sandwich immunoassay using magnetic nanoparticles (NP) functionalized with antibodies as capture particles and silica NP coated with horseradish peroxidase (HRP) and antibodies as labeling particles. *V. parahaemolyticus* was detected in the range 10^2 - 10^6 CFU mL⁻¹ with a LOD of 100 cells mL⁻¹. The method was then successfully applied to the analysis of spiked oyster samples.

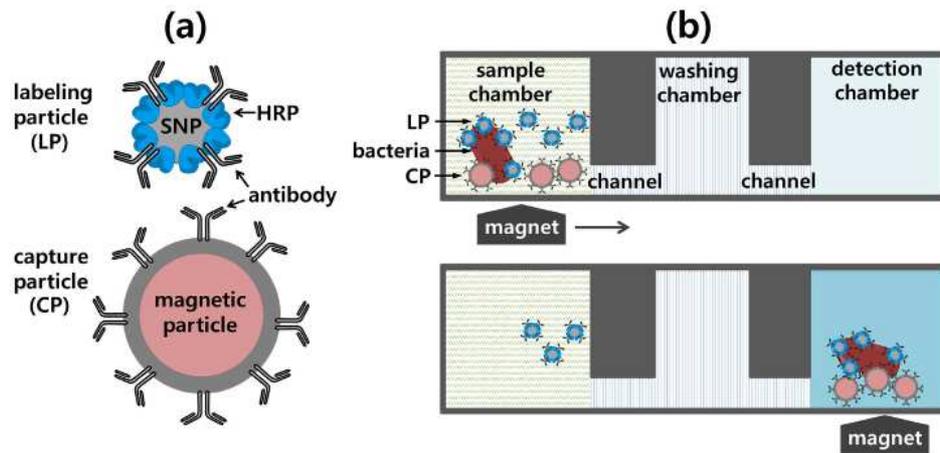


Figure 3 : Schematic representation of the detection principle. **(a)** Labeling particle and capture particle. **(b)** Detection process using the SLP LOC. The sample was added with LPs and CPs in the sample chamber, and moved to the detection chamber using a magnet. Detection was performed with TMB as the substrate of HRP. Reproduced from Ref. [26], with permission from Elsevier.

Alternatively to antibodies, aptamers constitute an interesting strategy for whole cell detection. These short oligonucleotides selected through an *in vitro* process (SELEX), are able to bind with high affinity and specificity to their target by a conformational change of their structure. Several aptamer-based assays were developed for *V. parahaemolyticus* detection.

The first assay, reported by Duan *et al.* [28], was based on a fluorescent “signal off” system. The aptamers were first mixed with the targeted bacteria, followed by the addition of a complementary DNA (cDNA) and a sensitive fluorescent dsDNA dye (AccuBlue®). The hybridization occurring between free aptamers and cDNA formed a double-stranded DNA (dsDNA) revealed by the insertion of AccuBlue®, leading to the generation of a fluorescent signal. The linear dynamic range of detection was 50 to 10^6 CFU mL⁻¹ with a LOD of 35 CFU mL⁻¹. No cross reaction with *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* was observed. When tested with spiked shrimp samples, results were similar to those obtained with plate counting method showing the usefulness of the developed aptasensor for real sample analysis.

In a colorimetric assay, aptamers immobilized on magnetic NP were employed as capture probes whereas gold NPs coated with other aptamers and HRP were used as signal probes [23]. The aptasensor responses were proportional to the target concentration in the range of 10 - 10^6 CFU mL⁻¹, with a LOD of 10 CFU mL⁻¹. No cross reactivity with other *Vibrio* and non-*Vibrio* strains was observed. The sensor validated with spiked water samples offered recoveries values between 92 and 102%.

An aptamer-based assay using surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection technique was also developed [24]. A first aptamer was immobilized on SiO₂ functionalized with gold NP (SiO₂@Au NPs) to capture the targeted bacteria. The captured cells were then revealed with a second aptamer conjugated to the Cyanine 3 fluorescent dye (**Figure 4**). A linear relationship between the SERS signal and the target concentration was obtained in the same range as described above [23], and with the same LOD. The developed sensor exhibited no cross reaction and good recovery rates ranging from 91 to 101% for spiked shrimp and water samples, respectively.

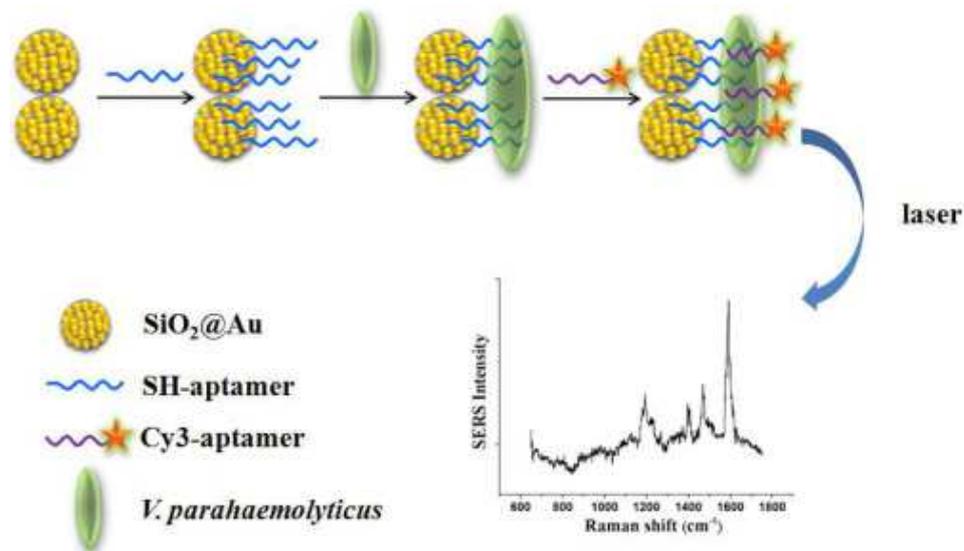


Figure 4 : Schematic illustration of SERS-based aptasensor for *V. parahaemolyticus* detection using SiO₂@Au core/shell NPs as the substrate. Reproduced from Ref. [24], with permission from Elsevier.

Table 2 : Characteristics of the optical biosensors developed for whole *Vibrio* cell detection. nd : not determined.

Target	Detection technique	Bioreceptor	Sensitivity	Specificity	Evaluation of real samples (% recoveries)	Reference
<i>V. cholerae</i> O1	SPR	Antibody	10 ⁵ cells mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[62]
<i>V. cholerae</i> O1	SPR	Antibody	43 cells mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[63]
<i>V. alginolyticus</i>	Fluorescence	Antibody	2.8 x 10 ² CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked shrimp samples (89.4-94.0%) Fishpond water (95.9-102.3%)	[27]
<i>V. parahaemolyticus</i>	Colorimetry	Antibody	100 cells mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked oyster samples (nd)	[26]
<i>V. parahaemolyticus</i>	Fluorescence	Aptamer	35 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked shrimp samples (nd)	[28]
<i>V. parahaemolyticus</i>	Colorimetry	Aptamer	10 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked water (92.0-102.0%)	[23]
<i>V. parahaemolyticus</i>	SERS	Aptamer	10 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked shrimp samples (91.0-97.8%) Seawater (99.4-101.0%) Groundwater (98.0-100.6%)	[24]

SERS : Surface Enhanced Raman Spectroscopy; SPR : Surface Plasmon Resonance.

Electrochemical biosensors

The different electrochemical immunosensors reported for the detection of whole *Vibrio* cells are listed in **Table 3**. No electrochemical aptasensor has been published so far for *Vibrio* detection.

The first electrochemical biosensor for the monitoring of whole *Vibrio* cells has been developed by Rao *et al.* [64]. This tool was based on the indirect sandwich ELISA principle, with the use of polyclonal antibodies (pAB) directed towards the pathogen species *V. cholerae*, that were adsorbed on the surface of a screen printed electrode (SPE). Antibodies conjugated to alkaline phosphatase (ALP) were used as enzyme tracer to reveal the bacterial cell binding, and 1-naphtyl phosphate as the enzyme substrate, giving an electroactive product that can be detected *via* an amperometric measurement. The data showed that no cross reaction was observed with the 3 other Gram negative strains tested and that 10^5 cells mL⁻¹ could be detected in only 55 minutes. This amperometric immunosensor was then applied to the analysis of spiked water samples detecting as few as 8 CFU mL⁻¹ in seawater and 80 CFU mL⁻¹ in tap water after an enrichment step [65].

A similar amperometric immunosensor allowing the detection of total *Vibrio* using a biotinylated pAB, immobilized on neutravidine modified surface of SPE was described [66]. A LOD of 4.0×10^2 cells mL⁻¹ was obtained without any enrichment step, in a total analytical time of 60 min.

Interestingly, two one-step label-free immunosensors were recently developed. The first one, designed for *V. cholerae* O1 detection, used antibodies covalently immobilized on a CeO₂ nanowire-modified sensor surface of a microelectrode to capture the targets. The resulting complex was detected by impedance analysis with [Fe(CN)₆]^{3-/4-} as the redox probe [67]. After optimization of experimental parameters a LOD of 1×10^2 CFU mL⁻¹ was obtained. Specificity was only assessed with few strains (*E. coli* and *Salmonella* spp.). The second one targeting *V. parahaemolyticus* was applied to real samples [68] (**Figure 5**). The electrode surface was modified with a magnetic graphene oxide to immobilized antibodies, and an electrochemiluminescence detection was performed, using N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol as label, to detect the targeted cells. The proposed immunosensor exhibited ultrasensitive, specific and rapid detection of *V. parahaemolyticus* in seawater (LOD of 5 CFU mL⁻¹), and in seafood (5 CFU g⁻¹).

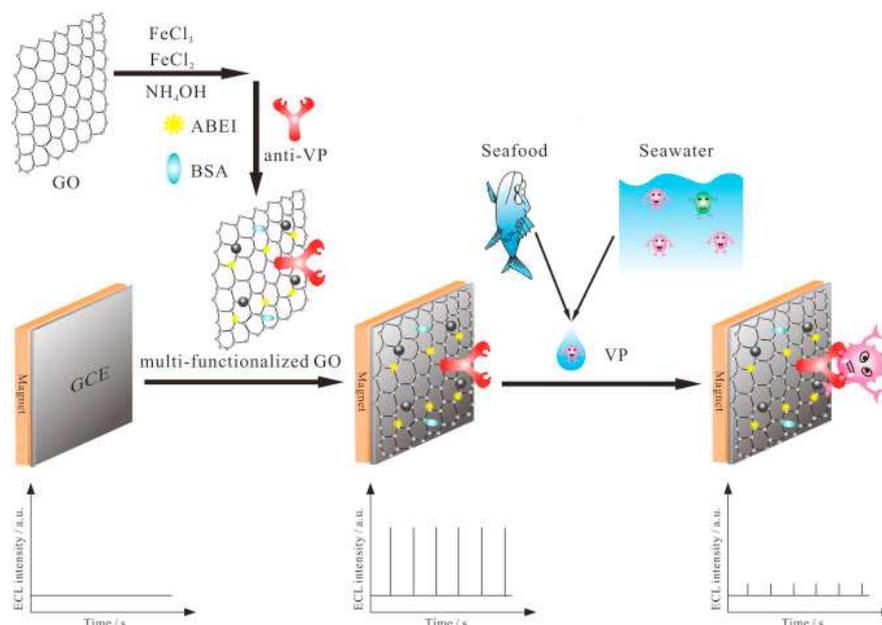


Figure 5 : The schematic diagram for the preparation of multi-functionalized graphene oxide and the ECL immunosensor. Reproduced from Ref. [68], with permission from Elsevier.

Table 3 : Characteristics of the electrochemical biosensors designed for whole *Vibrio* cell detection. nd : not determined.

Target	Detection technique	Bioreceptor	Sensitivity	Specificity	Evaluation of real samples (LOD)	Reference
<i>V. cholerae</i> O1	Amperometry	Antibody	10^5 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[64]
<i>V. cholerae</i> O1	Amperometry	Antibody	nd	No cross reaction	Spiked seawater and groundwater (8 CFU cells mL ⁻¹) Spiked tap water and sewer water (80 CFU cells mL ⁻¹)	[65]
<i>Vibrio</i> spp.	Amperometry	Antibody	$4 \cdot 10^2$ cells mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[66]
<i>V. cholerae</i> O1	Impedance	Antibody	10^2 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[67]
<i>V. parahaemolyticus</i>	Electrochemi-luminescence	Antibody	5 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked seawater (5 CFU mL ⁻¹) and seafood (5 CFU g ⁻¹)	[68]

Biosensing platforms for nucleic acid detection

Nucleic acid detection is mainly based on the natural affinity of either ssDNA or RNA to its complementary strand, allowing to target specific genes. This strategy based on hybridization has been extensively assessed for DNA microarrays development in biotechnology and clinical diagnostics, and is nowadays transferred towards strip test devices and biosensors, referred as genosensors.

Strip test devices

Contrary to strip test based on whole cell detection that were mainly developed for *V. cholerae* analysis, the corresponding devices based on nucleic acid detection have been developed for 5 well studied pathogen species of *Vibrio* (**Table 4**).

For all of these reported strip test devices, an amplification step is systematically applied on the extracted nucleic acids to generate DNA amplicons that were always labelled before analysis. As an example, *lolB* amplicons from *V. cholerae* were double tagged in 5' ends with biotin and fluorescein (FITC), and then captured on a glass-fiber membrane through biotin/streptavidin affinity [69]. The FITC was then recognized by anti-FITC antibodies coated with gold NPs to generate visual red lines. This LFA offered a detection sensitivity of 5 ng of PCR products, and a good specificity evaluated using 174 stool samples spiked with *V. cholerae* strains and other enteric bacteria.

In another study, the *ctxA* gene of *V. cholerae* was amplified by a LATE-PCR [44]. The amplicons were labeled with FITC and then bound to capture probes immobilized on the membrane. Hybridization revelation was performed using gold NPs coated with anti-FITC antibodies. This LFA showed sensitivities of 1 pg of pure genomic DNA and 10 CFU mL⁻¹ of toxigenic *V. cholerae*. The biosensor demonstrated 100% specificity using spiked stool and a complete agreement with the results of the ELISA method.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) coupled with a LFA using the *rpoX* gene as amplification target was described for *V. alginolyticus* detection [42]. The biotinylated amplicons were first hybridized to a FITC labeled probe recognized by gold-conjugated anti-FITC antibodies. This complex was then captured on the membrane using streptavidin. LODs of the assay were 1.8 x 10² CFU mL⁻¹ and 2 x 10³ CFU g⁻¹ for pure cultures and spiked shrimp samples, respectively. The same method coupling LAMP with LFA was applied for the

detection of other *Vibrio* species. In pure culture, the LODs obtained for *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* [47] and *V. harveyi* [48] were in the range of 10^2 CFU mL⁻¹, which was ten-fold lower than that observed for *V. vulnificus* [41]. A similar ratio between the LODs was also observed for real samples spiked with the same *Vibrio* strains.

In order to increase the sensitivity of the detection, an isothermal amplification technique, the cross-priming amplification, using multiple cross linked primers was combined with vertical flow assay to target the *tlh* gene of *V. parahaemolyticus* [40]. Amplicons were double tagged with biotin and FITC, and hybridization was performed as described above, leading to very interesting LODs of 1.8 CFU mL⁻¹ and 18 CFU g⁻¹ for pure culture and spiked oyster samples, respectively. In another study, the *toxR* gene of *V. parahaemolyticus* was detected by using the same lateral flow principle coupled with a multiple cross displacement amplification, a novel isothermal amplification technique that yield amplicons as low as 3 bacterial cells [70]. The test allowed the detection as low as 10 fg of DNA and 4.2×10^2 CFU mL⁻¹ for pure cultures and spiked oyster samples, respectively. Among the 143 tested strains, no cross-reaction was observed with other *Vibrio* and non-*Vibrio*.

A more innovative procedure was proposed by Park *et al.* for *V. parahaemolyticus* detection, using an microfluidic system integrating DNA extraction, LAMP amplification and LFA [51] (**Figure 6**). Amplicons double-tagged with biotin and digoxigenin were immobilized on strips using anti-digoxigenin. Visual purple lines were obtained by addition of streptavidin coated gold NPs. The assay exhibited a LOD of 10^4 CFU mL⁻¹. By incorporating the extraction, amplification and detection steps in only one device, this rotary microfluidic system offers a rapid and a high- throughput analysis as well as multiplexing possibilities.

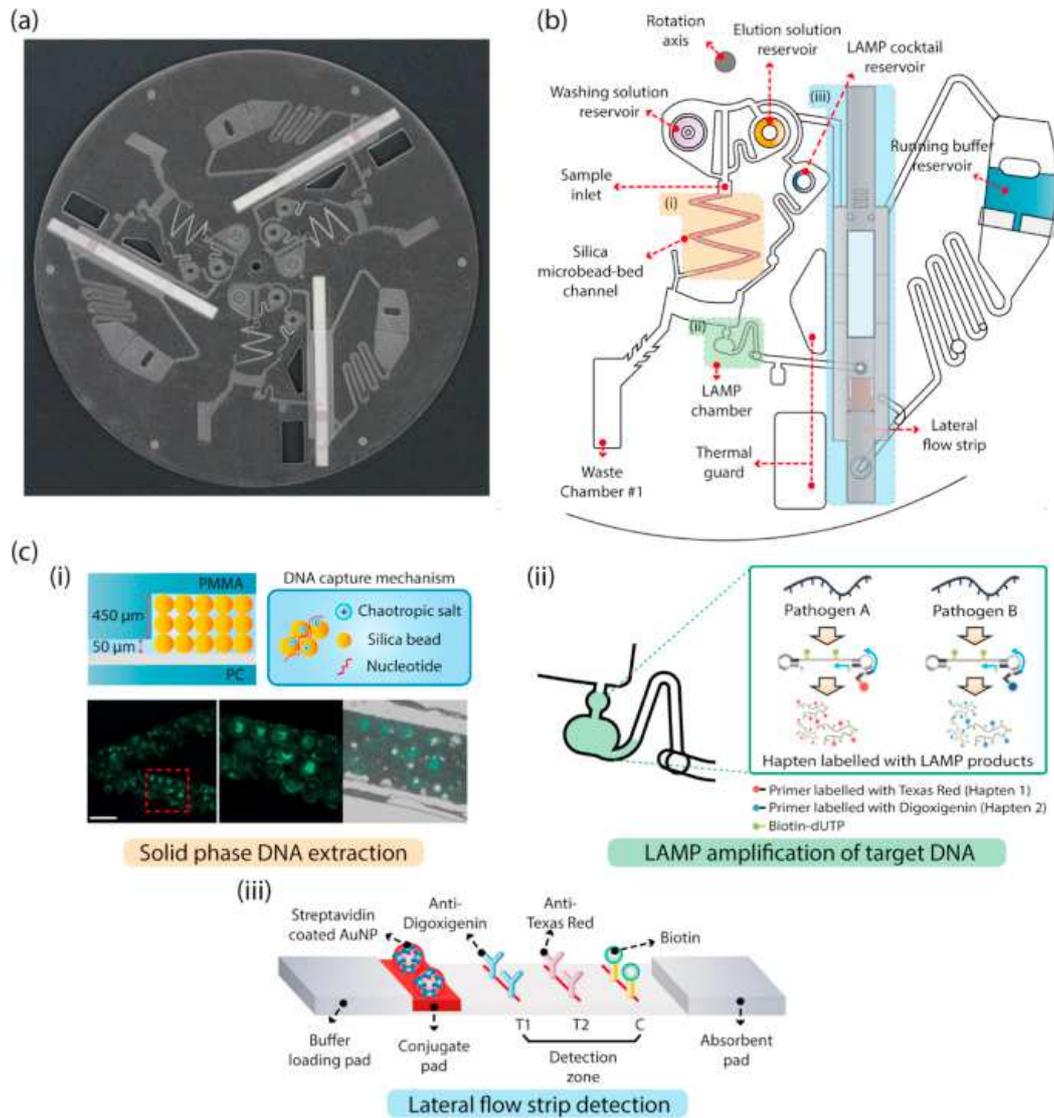


Figure 6 : (a) A digital image of the integrated rotary microdevice (b) Schematic illustration of the integrated rotary microdevice for the DNA extraction, the LAMP reaction, and the lateral flow strip detection. (c-i) Schematic design of the solid phase DNA extraction unit and the fluorescence images of the FAM-labelled DNA adsorbed glass microbeads, (c-ii) Schematic image of the LAMP amplification of target DNA (c-iii) Schematics of a lateral flow strip which consists of a buffer loading pad, a conjugate pad that contains streptavidin coated gold NPs, a detection zone where an anti-Digoxigenin, an anti-Texas red, a biotin are immobilized in the test line 1, the test line 2 and the control line, respectively, and an absorbent pad. Reproduced from Ref. [51], with permission from Elsevier.

Table 4 : Characteristics of the strip tests developed for the detection of nucleic acids extracted from *Vibrio* bacteria.

Target (gene)	Principle	Bioreceptor	Sensitivity	Specificity	Evaluation of real samples (LOD)	Reference
<i>V. cholerae</i> (<i>tolB</i>)	PCR + LFA	Antibody	5 ng of amplicons	No cross reaction	Spiked stool samples	[69]
<i>V. cholerae</i> (<i>ctxA</i>)	LATE-PCR + LFA	Biotinylated capture probe	1 pg of genomic DNA 10 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked stool samples	[44]
<i>V. alginolyticus</i> (<i>rpoX</i>)	LAMP + LFA	FITC labeled probe	1.8 x 10 ² CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked whiteleg shrimp samples (2.0 x 10 ³ CFU g ⁻¹)	[42]
<i>V. parahaemolyticus</i> (<i>tlh</i>)	LAMP + LFA	FITC labeled probe	120 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked shrimp samples (1.8 x 10 ³ CFU g ⁻¹)	[47]
<i>V. harveyi</i> (<i>vvhP2</i>)	LAMP + LFA	FITC labeled probe	1.1 x 10 ² CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked shrimp samples (1.8 x 10 ³ CFU g ⁻¹)	[48]
<i>V. vulnificus</i> (<i>rpoS</i>)	LAMP + LFA	FITC labeled probe	1.5 x 10 ³ CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked oyster samples (1.2 x 10 ⁴ CFU g ⁻¹)	[41]
<i>V. parahaemolyticus</i> (<i>tlh</i>)	CPA + vertical flow	Antibody	1.8 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked oyster samples (18 CFU g ⁻¹)	[40]
<i>V. parahaemolyticus</i> (<i>toxR</i>)	MCDA + LFA	Antibody	10 fg of DNA 4.2 x 10 ² CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked oyster homogenates (4.2 x 10 ² CFU g ⁻¹)	[70]
<i>V. parahaemolyticus</i> (<i>toxR</i>)	Microfluidic system incorporating LAMP + LFA	Antibody	10 ⁴ CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked milk samples (5.0 x 10 ³ CFU/5μL)	[51]

LFA : lateral flow assay; LATE-PCR : linear after the exponential PCR; LAMP : loop mediated isothermal amplification; CPA : cross priming amplification; MCDA : multiple cross displacement amplification.

Optical biosensors

Few optical biosensors have been developed for the detection of nucleic acids from *Vibrio* species (**Table 5**). The first one, proposed by Lee *et al.* in 2003, was based on multiplex PCR followed by a colorimetric sandwich hybridization assay, allowing the simultaneous detection of *V. vulnificus*, *V. cholerae*, and *V. parahaemolyticus* [71]. After amplification, amplicons were hybridized between a phosphorylated capture probe immobilized on the surface of functionalized microplate and a biotinylated signal probe recognized by a PAL-avidin conjugate. When tested with oyster tissue homogenates, the assay allowed the detection as low as 10^2 CFU g^{-1} for each pathogen.

These last years, other optical biosensors that did not require PCR amplification before nucleic acid analysis were developed. A label-free photoluminescent device, based on target DNA hybridization with complementary DNA probes coated onto nanostructured magnesium oxide NPs, was designed for *V. cholerae* detection [49]. Photoluminescence signal was proportional to the target DNA concentration in the range 100-500 ng μL^{-1} with a LOD of 3.133 ng μL^{-1} . More recently, the detection of *V. cholerae ompW* gene was achieved using a sandwich hybridization format device in which the target was recognized by both capture probes coated on magnetic NPs and FAM labeled probes immobilized on gold NPs [55]. The reported device exhibited linear relationship between fluorescence emission and target DNA concentration in the range 10 to 250 ng mL^{-1} , with a LOD value of 2.34 ng mL^{-1} .

Due to its high copy number in prokaryote genomes, the presence of highly conserved regions and its *a priori* single stranded form, the rRNA molecule has been intensively used in biosensors for pathogen detection [72]. However, only one study reported the detection of *Vibrio* using rRNA instead of DNA molecules [50]. In this system, the target was bound between an immobilized capture probe and a labelled signal probe and hybridization event was revealed by chemiluminescence (**Figure 7**). The described assay showed high specificity and a LOD of 5 ng μL^{-1} of RNA. *Vibrio* detection was achieved using pure cultures as well as spiked and real environmental samples. The study demonstrated that the microplates could be coated beforehand with capture probes and stored at 4°C for at least 1 month, in order to significantly reduce analysis time.

We could notice that the LOD values reported for these optical biosensors were not converted into CFU mL^{-1} which make comparison with other methods difficult.

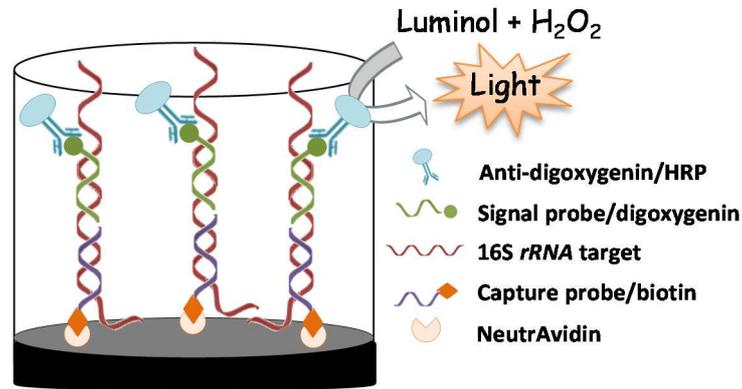


Figure 7 : Schematic illustration of the chemiluminescent DNA-based assay for *Vibrio* spp. detection [50].

Table 5 : Characteristics of the optical biosensors developed for the detection of nucleic acids extracted from *Vibrio* bacteria. nd : not determined.

Target (gene)	PCR amplification	Detection technique	Bioreceptor	Sensitivity	Specificity	Evaluation of real samples (LOD)	Reference
<i>V. vulnificus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> (<i>vvh</i> , <i>ctx</i> , <i>tlh</i>)	Yes	Colorimetry	DNA probe	nd	No cross reaction	Oyster tissue homogenates (10 ² CFU g ⁻¹)	[71]
<i>V. cholerae</i> (nd)	No	Photoluminescence	DNA probe	3.133 ng μL ⁻¹	nd	nd	[49]
<i>V. cholerae</i> (<i>ompW</i>)	No	Fluorescence	DNAprobe	2.34 ng mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[55]
<i>Vibrio</i> spp. (<i>16S rRNA</i>)	No	Chemiluminescence	DNA probe	5 ng μL ⁻¹	No cross reaction	Phytoplankton and spiked seawater (nd)	[50]

Electrochemical biosensors

The different electrochemical genosensors reported for the detection of nucleic acids from *Vibrio* bacteria are summarized in **Table 6**.

The first electrochemical genosensor was reported in 2008, and used amperometry for the detection of PCR amplicons from *lolB* gene of *V. cholerae* [37]. Amplicons were labelled both by biotin for the immobilization on streptavidin modified surface of a carbon SPE, and by fluorescein. They were then detected with HRP conjugated anti fluorescein antibodies, followed by the addition of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and H₂O₂. The oxidation signal was analyzed using intermittent pulse amperometry, achieving a LOD of 10 CFU mL⁻¹ of *V. cholerae* under the optimum conditions, and a good specificity. This system was then modified using asymmetric PCR to obtain ssDNA that could be integrated in a sandwich type hybridization strategy. This new format, associated with chrono-amperometry detection allowed a good sensitivity (0.85 ng μL⁻¹) and specificity of the analysis [38].

Multiplex LATE-PCR assay was proposed to generate ssDNA amplicons from *toxR* gene that were integrated in an electrochemical genosensor also using a sandwich hybridization format. The complex was detected by an anti-FITC PAL conjugated, that converts the substrate into electroactive α-naphtol, detected by amperometric measurement [52]. Nucleic acids extracted from bacterial cultures and from spiked stools samples were used to validate the reported system. Two years later, the same research group has proposed a simplified version of this genosensor by developing a dry-reagent LATE PCR that just need addition of DNA template and water to reconstitute the amplification mix, thus reducing the complexity of the assay [39].

Interestingly, since 2013 magnetic beads and NPs were often included in the development of electrochemical genosensors for *Vibrio* detection. As an example, the use of streptavidin magnetic beads and antibody conjugated gold NPs was reported for the analysis of asymmetric PCR amplicons from *V. cholerae lolB* gene, in order to increase the surface area for bioreactions, and to label the complex, respectively [73]. The new biosensor was successfully applied to the analysis of spiked stool samples, using differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) for the electrochemical detection of the chemically dissolved gold NPs, leading to a LOD of 10³ CFU mL⁻¹ of *V. cholerae*. A new strategy, developed by the same authors, used gold NPs loaded onto a latex microsphere carrier to amplify the signal,

and thus to improve the sensitivity of the assay [45]. A LOD of 2 CFU mL⁻¹ of *V. cholerae* in spiked stool samples was recorded using DPASV. Sensitivity of this approach was lower than that of other methods. Furthermore, an internal control was incorporated to this system to provide instant validation of the results, thus giving maximum diagnosis reliability. The new platform was validated with 38 reference bacterial strains, along with 145 clinical isolates, with a total assay time from sampling to measurement of less than 6h comprising 3h of enrichment step [46]. In another work, gold NPs adsorbed on layer-by-layer modified latex were also integrated in a novel lyophilized reagent-based test. Measurements were performed following the same procedure as described above using either PCR or LAMP products for preliminary assays [43]. Interestingly, the lyophilized reagents were stable at room temperature for up to 1 month.

Two genosensors for the detection of *V. cholerae* O1 were proposed by the same research team using short fragments of genomic DNA, without the need of PCR amplification before analysis. These devices are both based on the use of nanostructured magnesium oxide for the electrode fabrication, either modified by chitosan [53], or grafted carboxyl functionalized MWCNT [54]. In the first method, DPV was applied to study the electrochemical response of methylene blue (MB), used as a redox probe to characterize the DNA complex formation. A LOD of 35.2 ng μL^{-1} of DNA was obtained, associated to a fast response time of 3 seconds [53]. In the second one, electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was conducted with $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as redox probe, allowing a similar LOD of 21.7 ng μL^{-1} of DNA in 25 seconds [54]. Although these two genosensors showed interesting results with *V. cholerae* strains, their specificity was not tested with genomic DNA from other bacteria. Only matrix effect was assessed with glucose, cholesterol, ascorbic acid and sodium chloride.

Recently, a PCR-free electrochemical genosensor was adapted to the detection of *V. parahaemolyticus*, based on SPE modified with gold nanoparticles, and MB as the redox probe [56] (**Figure 8**). The hybridization reaction between the capture probe and the ssDNA molecule was recorded through DPV, with a LOD of 2.6 pM. The reported portable genosensor was successfully applied on spiked cockle samples.



Figure 8 : Schematic drawing of electrochemical DNA biosensor based on polylactide-stabilized gold nanoparticles modified electrode. Reproduced from Ref. [74], with permission from Elsevier.

Table 6 : Characteristics of the electrochemical biosensors developed for the detection of nucleic acids extracted from *Vibrio* bacteria. nd : not determined.

Target (gene)	PCR amplification	Detection technique	Bioreceptor	Sensitivity	Specificity	Evaluation of real samples (LOD)	Reference
<i>V. cholerae</i> (<i>lolB</i>)	Yes	Intermittent Pulse Amperometry	DNA probe	10 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	nd	[37]
<i>V. cholerae</i> (<i>lolB</i>)	Yes	Chrono amperometry	DNA probe	0.85 ng µL ⁻¹	No cross reaction	nd	[38]
<i>V. cholerae</i> (<i>toxR</i>)	Yes	Amperometry	DNA probe	8-61 pM of synthetic target	No cross reaction	Spiked stools (nd)	[52]
<i>V. cholerae</i> (<i>toxR</i>)	Yes	Amperometry	DNA probe	10 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked stools (nd)	[39]
<i>V. cholerae</i> (<i>lolB</i>)	Yes	DPASV	DNA probe	5 pg µL ⁻¹	No cross reaction	Spiked stools (10 ³ CFU mL ⁻¹)	[73]
<i>V. cholerae</i> (<i>lolB</i>)	Yes	DPASV	DNA probe	nd	No cross reaction	Spiked stools (2 CFU mL ⁻¹)	[45]
<i>V. cholerae</i> (<i>lolB</i>)	Yes	DPASV	DNA probe	0.5 ng mL ⁻¹ 10 CFU mL ⁻¹	No cross reaction	Spiked stools (nd)	[46]
<i>V. cholerae</i> (<i>lolB</i>)	Yes	DPASV	DNA probe	1 fM	No cross reaction	nd	[43]
<i>V. cholerae</i> O1 (nd)	No	DPV	DNA probe	35.2 ng µL ⁻¹	nd	nd	[53]
<i>V. cholerae</i> O1 (nd)	No	EIS	DNA probe	21.7 ng µL ⁻¹	nd	Human blood/serum (nd)	[54]
<i>V. parahaemolyticus</i> (nd)	No	DPV	DNA probe	2.6 pM	No cross reaction	Spiked cockle samples (nd)	[56]

DPASV : differential pulse anodic stripping voltammetry; DPV : differential pulse voltammetry; EIS : electrochemical impedance spectroscopy.

Conclusions

Global climate changes associated with anthropogenic activities have led to the increase in *Vibrio* infections in humans and marine animals worldwide. Thus, there is a real need for rapid, sensitive and accurate detection of these bacteria. However, *Vibrio* detection still primarily relies on laborious and time consuming cultural approaches. To overcome these limitations, biosensing platforms (i.e. biosensors and strip tests) have emerged as attractive and effective alternatives to detect *Vibrio* bacteria in various matrix. Thus, this review aims to illustrate the current state of the art in biosensors and strip tests development for *Vibrio* monitoring.

We can directly notice that the large majority of the devices described in this article is dedicated to the analysis of *Vibrio* species pathogenic for human, especially *V. cholerae*. Surprisingly, despite the important economic losses attributed to some *Vibrio* in aquaculture, the use of biosensing platforms in this area is still in its infancy.

The sensitivity of the developed tools is a critical point for bacteria detection and identification. Thus, pushing sensitivity towards single cell limit of detection is essential to prevent infections and to ensure environmental safety. For this purpose, nanomaterials such as nanoparticles and nanotubes, have been recently incorporated to biosensing platforms.

The specificity of the developed devices constitutes another important aspect. However, in most of the studies presented here, this parameter was evaluated only on a limited number of targeted and non-targeted strains. Furthermore, the applicability of the devices was rarely tested on naturally contaminated samples.

In the case of genosensor analysis, the extraction of nucleic acids is a critical step. Although the development of a microfluidic system integrating DNA extraction was recently reported [51], efforts have still to be made to automate and incorporate the extraction step into biosensing platforms. Another point that we have to emphasize is that the majority of the reviewed genosensors requires a preliminary amplification of the target, increasing analysis time.

In order to bring biosensing platforms from the lab to the field, the future trend is towards the development of integrated systems incorporating all the analytical steps from sample preparation to data collection.

Acknowledgments

Authors would like to acknowledge the University of Perpignan Via Domitia, France, for its financial support through Doctoral School 305.

Conflicts of interest : none

References

- [1] M. Bruto, A. James, B. Petton, Y. Labreuche, S. Chenivesse, M. Alunno-Bruscia, M.F. Polz, F. Le Roux, *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition, *ISME Journal*. 4 (2017) 1043-1052.
- [2] D.J. Grimes, C.N. Johnson, K.S. Dillon, A.R. Flowers, N.F. Noriega, T. Berutti, What Genomic Sequence Information Has Revealed About *Vibrio* Ecology in the Ocean—A Review, *Microb. Ecol.* 58 (2009) 447–460. doi:10.1007/s00248-009-9578-9.
- [3] WHO Cholera surveillance and number of cases. Geneva: World Health Organization, (2014).
- [4] M. Ali, A.R. Nelson, A.L. Lopez, D.A. Sack, Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries, *PLOS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) e0003832. doi:10.1371/journal.pntd.0003832.
- [5] COVIS, annual summaries on human *Vibrio* cases reported to CDC. <https://www.cdc.gov/vibrio/surveillance.html>.
- [6] B. Austin, D.A. Austin, *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish*, 4th edn (2007), Springer Praxis, Godalming.
- [7] M. Garnier, Y. Labreuche, J.-L. Nicolas, Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*, *Syst. Appl. Microbiol.* 31 (2008) 358–365. doi:10.1016/j.syapm.2008.06.003.
- [8] L.D. de la Peña, C.R. Lavilla-Pitogo, M.G. Paner, Luminescent vibrios associated with mortality in pond-cultured shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines: species composition, *Fish Pathol.* 36 (2001) 133–138.
- [9] C. Goarant, D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, S. De Decker, “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*, *Aquaculture*. 253 (2006) 105–113. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.07.031.
- [10] S.L. Abbott, L.S. Seli, M. Catino, M.A. Hartley, J.M. Janda, Misidentification of Unusual *Aeromonas* Species as Members of the Genus *Vibrio*: a Continuing Problem, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 1103–1104.
- [11] L. Croci, E. Suffredini, L. Cozzi, L. Toti, D. Ottaviani, C. Pruzzo, P. Serratore, R. Fischetti, E. Goffredo, G. Loffredo, R. Mioni, and the *Vibrio parahaemolyticus* Working Group, Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *J. Appl. Microbiol.* 102 (2007) 229–237. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03046.x.
- [12] W. Baffone, B. Citterio, E. Vittoria, A. Casaroli, R. Campana, L. Falzano, G. Donelli, Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp., *Int. J. Food Microbiol.* 89 (2003) 31–39. doi:10.1016/S0168-1605(03)00102-8.
- [13] N. Binsztejn, M.C. Costagliola, M. Pichel, V. Jurquiza, F.C. Ramirez, R. Akselman, M. Vacchino, A. Huq, R. Colwell, Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic

- Environment of Argentina, Appl. Environ. Microbiol. 70 (2004) 7481–7486. doi:10.1128/AEM.70.12.7481-7486.2004.
- [14] H.C. Wong, P. Wang, Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses, J. Appl. Microbiol. 96 (2004) 359–366. doi:10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x.
- [15] F. Coutard, M. Pommepuy, S. Loaec, D. Hervio-Heath, mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state, J. Appl. Microbiol. 98 (2005) 951–961. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02534.x.
- [16] B.K.-N. Amel, B. Amine, B. Amina, Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions, Microbiol. Res. 163 (2008) 323–328. doi:10.1016/j.micres.2006.06.006.
- [17] M. Nayak, A. Kotian, S. Marathe, D. Chakravorty, Detection of microorganisms using biosensors - A smarter way towards detection techniques, Biosens. Bioelectron. 25 (2009) 661–667. doi:10.1016/j.bios.2009.08.037.
- [18] P. Poltronieri, V. Mezzolla, E. Primiceri, G. Maruccio, Biosensors for the Detection of Food Pathogens, Foods 3 (2014) 511–526. doi:10.3390/foods3030511.
- [19] S.M. Yoo, S.Y. Lee, Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms, Trends Biotechnol. 34 (2016) 7–25. doi:10.1016/j.tibtech.2015.09.012.
- [20] A. Thattiyaphong, K. Okada, S. Khangrang, W. Nispa, P. Sawanpanyalert, T. Honda, Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139, Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 44 (2013) 448–55.
- [21] C. Pengsuk, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, P. Sithigorngul, Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafood samples, Biosens. Bioelectron. 42 (2013) 229–235. doi:10.1016/j.bios.2012.10.011.
- [22] P. Zhao, Y. Wu, Y. Zhu, X. Yang, X. Jiang, J. Xiao, Y. Zhang, C. Li, Upconversion fluorescent strip sensor for rapid determination of *Vibrio anguillarum*, Nanoscale. 6 (2014) 3804–3809. doi:10.1039/C3NR06549A.
- [23] S. Wu, Y. Wang, N. Duan, H. Ma, Z. Wang, Colorimetric Aptasensor Based on Enzyme for the Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Agric. Food Chem. 63 (2015) 7849–7854. doi:10.1021/acs.jafc.5b03224.
- [24] N. Duan, Y. Yan, S. Wu, Z. Wang, *Vibrio parahaemolyticus* detection aptasensor using surface-enhanced Raman scattering, Food Control. 63 (2016) 122–127. doi:10.1016/j.foodcont.2015.11.031.
- [25] X. Liu, Y. Guan, S. Cheng, Y. Huang, Q. Yan, J. Zhang, G. Huang, J. Zheng, T. Liu, Development of a highly sensitive lateral immunochromatographic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Microbiol. Methods. 131 (2016) 78–84. doi:10.1016/j.mimet.2016.10.007.
- [26] B. Park, S.-J. Choi, Sensitive immunoassay-based detection of *Vibrio parahaemolyticus* using capture and labeling particles in a stationary liquid phase lab-on-a-chip, Biosens. Bioelectron. 90 (2017) 269–275. doi:10.1016/j.bios.2016.11.071.
- [27] Y. Liu, J. Hu, J.-S. Sun, Y. Li, S.-X. Xue, X.-Q. Chen, X.-S. Li, G.-X. Du, Facile synthesis of multifunctional multi-walled carbon nanotube for pathogen *Vibrio alginolyticus* detection in fishery and environmental samples, Talanta. 128 (2014) 311–318. doi:10.1016/j.talanta.2014.04.048.
- [28] N. Duan, S. Wu, X. Ma, Y. Xia, Z. Wang, A universal fluorescent aptasensor based on AccuBlue dye for the detection of pathogenic bacteria, Anal. Biochem. 454 (2014) 1–6.

- doi:10.1016/j.ab.2014.03.005.
- [29] P. Kalluri, A. Naheed, S. Rahman, M. Ansaruzzaman, A.S.G. Faruque, M. Bird, F. Khatun, N.A. Bhuiyan, F. Nato, J.-M. Fournier, C. Bopp, R.F. Breiman, G.B. Nair, E.D. Mintz, Evaluation of three rapid diagnostic tests for cholera: does the skill level of the technician matter?, *Trop. Med. Int. Health.* 11 (2006) 49–55. doi:10.1111/j.1365-3156.2005.01539.
- [30] J.R. Harris, E.C. Cavallaro, A.A. De Nóbrega, J.C.B. Dos S. Barrado, C. Bopp, M.B. Parsons, D. Djalo, F.G. da S. Fonseca, U. Ba, A. Semedo, J. Sobel, E.D. Mintz, Field evaluation of Crystal VC[®] Rapid Dipstick test for cholera during a cholera outbreak in Guinea-Bissau: Evaluation of a rapid test for cholera, *Trop. Med. Int. Health.* 14 (2009) 1117–1121. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02335.x.
- [31] P. Mukherjee, S. Ghosh, T. Ramamurthy, M.K. Bhattacharya, R.K. Nandy, Y. Takeda, G.B. Nair, A.K. Mukhopadhyay, Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick kit for diagnosis of cholera emphasizes its outbreak utility, *Jpn. J. Infect. Dis.* 63 (2010) 234–238.
- [32] A. Sinha, S. Sengupta, S. Ghosh, S. Basu, D. Sur, S. Kanungo, A.K. Mukhopadhyay, T. Ramamurthy, K. Nagamani, M. Narsing Rao, R.K. Nandy, Evaluation of a rapid dipstick test for identifying cholera cases during the outbreak, *Indian J. Med. Res.* 135 (2012) 523–528.
- [33] A.-L. Page, K.P. Alberti, V. Mondonge, J. Rauzier, M.-L. Quilici, P.J. Guerin, Evaluation of a Rapid Test for the Diagnosis of Cholera in the Absence of a Gold Standard, *PLoS One.* 7 (2012) e37360. doi:10.1371/journal.pone.0037360.
- [34] C.M. George, M. Rashid, D.A. Sack, R. Bradley Sack, K.M. Saif-Ur-Rahman, A.S. Azman, S. Monira, S.I. Bhuyian, K.M. Zillur Rahman, M. Toslim Mahmud, M. Mustafiz, M. Alam, Evaluation of enrichment method for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using a rapid dipstick test in Bangladesh, *Trop. Med. Int. Health.* 19 (2014) 301–307. doi:10.1111/tmi.12252.
- [35] N.A. Bhuiyan, F. Qadri, A.S.G. Faruque, M.A. Malek, M.A. Salam, F. Nato, J.M. Fournier, S. Chanteau, D.A. Sack, G. Balakrish Nair, Use of Dipsticks for Rapid Diagnosis of Cholera Caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 from Rectal Swabs, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 3939–3941. doi:10.1128/JCM.41.8.3939-3941.2003.
- [36] L.N. Ontweka, L.O. Deng, J. Rauzier, A.K. Debes, F. Tadesse, L.A. Parker, J.F. Wamala, B.K. Bior, M. Lasuba, A.B. But, Cholera Rapid Test with Enrichment Step Has Diagnostic Performance Equivalent to Culture, *PloS One.* 11 (2016) e0168257.
- [37] C.Y. Yean, B. Kamarudin, D.A. Ozkan, L.S. Yin, P. Lalitha, A. Ismail, M. Ozsoz, M. Ravichandran, Enzyme-Linked Amperometric Electrochemical Genosensor Assay for the Detection of PCR Amplicons on a Streptavidin-Treated Screen-Printed Carbon Electrode, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2774–2779. doi:10.1021/ac702333x.
- [38] K.-F. Low, K. Chuenrangsikul, P. Rijiravanich, W. Surareungchai, Y.-Y. Chan, Electrochemical genosensor for specific detection of the food-borne pathogen, *Vibrio cholerae*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28 (2012) 1699–1706. doi:10.1007/s11274-011-0978-x.
- [39] C.Y. Yu, G.Y. Ang, K.G. Chan, K.K. Banga Singh, Y.Y. Chan, Enzymatic electrochemical detection of epidemic-causing *Vibrio cholerae* with a disposable oligonucleotide-modified screen-printed bisensor coupled to a dry-reagent-based nucleic acid amplification assay, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 282–288. doi:10.1016/j.bios.2015.03.048.
- [40] D. Xu, X. Wu, J. Han, L. Chen, L. Ji, W. yan, Y. Shen, A cross-priming amplification assay coupled with vertical flow visualization for detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Mol. Cell. Probes.* 29 (2015) 527–530. doi:10.1016/j.mcp.2015.07.007.

- [41] T. Surasilp, S. Longyant, S. Rukpratanporn, P. Sridulyakul, P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, Rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *rpoS* gene, Mol. Cell. Probes. 25 (2011) 158–163. doi:10.1016/j.mcp.2011.04.001.
- [42] S. Plaon, S. Longyant, P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio alginolyticus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Lateral Flow Dipstick Targeted to the *rpoX* Gene, J. Aquat. Anim. Health. 27 (2015) 156–163. doi:10.1080/08997659.2015.1037468.
- [43] P.S. Liew, B. Lertanantawong, S.Y. Lee, R. Manickam, Y.H. Lee, W. Surareungchai, Electrochemical genosensor assay using lyophilized gold nanoparticles/latex microsphere label for detection of *Vibrio cholerae*, Talanta. 139 (2015) 167–173. doi:10.1016/j.talanta.2015.02.054.
- [44] G.Y. Ang, C.Y. Yu, K.G. Chan, K.K.B. Singh, Y. Chan Yean, Development of a dry-reagent-based nucleic acid-sensing platform by coupling thermostabilised LATE-PCR assay to an oligonucleotide-modified lateral flow biosensor, J. Microbiol. Methods. 118 (2015) 99–105. doi:10.1016/j.mimet.2015.08.024.
- [45] K.-F. Low, P. Rijiravanich, K.K.B. Singh, W. Surareungchai, C.Y. Yean, An Electrochemical Genosensing Assay Based on Magnetic Beads and Gold Nanoparticle-Loaded Latex Microspheres for *Vibrio cholerae* Detection, J. Biomed. Nanotechnol. 11 (2015) 702–710. doi:10.1166/jbn.2015.1956.
- [46] K.-F. Low, Z.M. Zain, C.Y. Yean, A signal-amplified electrochemical DNA biosensor incorporated with a colorimetric internal control for *Vibrio cholerae* detection using shelf-ready reagents, Biosens. Bioelectron. 87 (2017) 256–263. doi:10.1016/j.bios.2016.08.064.
- [47] P. Prompamorn, P. Sithigorngul, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Sridulyakul, P. Chaivisuthangkura, The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Lett. Appl. Microbiol. 52 (2011) 344–351. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03007.x.
- [48] K. Thongkao, S. Longyant, K. Silprasit, P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, Rapid and sensitive detection of *Vibrio harveyi* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *vhhP2* gene, Aquacult. Res. 46 (2013) 1122–1131. doi:10.1111/are.12266.
- [49] M.K. Patel, M.A. Ali, S. Krishnan, V.V. Agrawal, A.A. Al Kheraif, H. Fouad, Z.A. Ansari, S.G. Ansari, B.D. Malhotra, A Label-Free Photoluminescence Genosensor Using Nanostructured Magnesium Oxide for Cholera Detection, Sci. Rep. 5 (2015). doi:10.1038/srep17384.
- [50] E. Da-Silva, L. Barthelmebs, J. Baudart, 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. R. 24 (2017) 5690–5700. doi:10.1007/s11356-016-8193-9.
- [51] B.H. Park, S.J. Oh, J.H. Jung, G. Choi, J.H. Seo, D.H. Kim, E.Y. Lee, T.S. Seo, An integrated rotary microfluidic system with DNA extraction, loop-mediated isothermal amplification, and lateral flow strip based detection for point-of-care pathogen diagnostics, Biosens. Bioelectron. 91 (2017) 334–340. doi:10.1016/j.bios.2016.11.063.
- [52] C.Y. Yu, G.Y. Ang, C.Y. Yean, Multiplex electrochemical genosensor for identifying toxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139, Chem. Comm. 49 (2013) 2019. doi:10.1039/c3cc39144b.
- [53] M.K. Patel, M.A. Ali, M. Zafaryab, V.V. Agrawal, M.M.A. Rizvi, Z.A. Ansari, S.G. Ansari, B.D.

- Malhotra, Biocompatible nanostructured magnesium oxide-chitosan platform for genosensing application, *Biosens. Bioelectron.* 45 (2013a) 181–188. doi:10.1016/j.bios.2012.12.055.
- [54] M.K. Patel, M.A. Ali, S. Srivastava, V.V. Agrawal, S.G. Ansari, B.D. Malhotra, Magnesium oxide grafted carbon nanotubes based impedimetric genosensor for biomedical application, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013b) 406–413. doi:10.1016/j.bios.2013.07.006.
- [55] A. Narmani, M. Kamali, B. Amini, H. Kooshki, A. Amini, L. Hasani, Highly sensitive and accurate detection of *Vibrio cholera* O1 *OmpW* gene by fluorescence DNA biosensor based on gold and magnetic nanoparticles, *Proc. Biochem.* 65 (2017) 46–54. doi:10.1016/j.procbio.2017.10.009.
- [56] N. Nordin, N.A. Yusof, J. Abdullah, S. Radu, R. Hushiarian, A simple, portable, electrochemical biosensor to screen shellfish for *Vibrio parahaemolyticus*, *AMB Express.* 7 (2017). doi:10.1186/s13568-017-0339-8.
- [57] F. Nato, A. Boutonnier, M. Rajerison, P. Grosjean, S. Dartevelle, A. Guenole, N.A. Bhuiyan, D.A. Sack, G.B. Nair, J.M. Fournier, S. Chanteau, One-Step Immunochromatographic Dipstick Tests for Rapid Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Stool Samples, *Clin. Vaccine Immunol.* 10 (2003) 476–478. doi:10.1128/CDLI.10.3.476-478.2003.
- [58] X.-Y. Wang, M. Ansaruzzaman, R. Vaz, C. Mondlane, M.E. Lucas, L. von Seidlein, J.L. Deen, S. Ampuero, M. Puri, T. Park, G. Nair, J.D. Clemens, C.-L. Chaignat, M. Rajerison, F. Nato, J.-M. Fournier, Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population, *BMC Infect. Dis.* 6 (2006). doi:10.1186/1471-2334-6-17.
- [59] S. Chakraborty, M. Alam, H.M. Scobie, D.A. Sack, Adaptation of a simple dipstick test for detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in environmental water, *Front. Microbiol.* 4 (2013). doi:10.3389/fmicb.2013.00320.
- [60] B. Ley, A.M. Khatib, K. Thriemer, L. von Seidlein, J. Deen, A. Mukhopadhyay, N.-Y. Chang, R. Hashim, W. Schmied, C.J.-L. Busch, R. Reyburn, T. Wierzba, J.D. Clemens, H. Wilfing, G. Enwere, T. Aguado, M.S. Jiddawi, D. Sack, S.M. Ali, Evaluation of a Rapid Dipstick (Crystal VC) for the Diagnosis of Cholera in Zanzibar and a Comparison with Previous Studies, *PLoS One.* 7 (2012) e36930. doi:10.1371/journal.pone.0036930.
- [61] W. Chen, J. Zhang, G. Lu, Z. Yuan, Q. Wu, J. Li, G. Xu, A. He, J. Zheng, J. Zhang, Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa, *Clin. Biochem.* 47 (2014) 448–454. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.12.022.
- [62] J.-Y. Jyoung, S. Hong, W. Lee, J.-W. Choi, Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2315–2319. doi:10.1016/j.bios.2005.10.015.
- [63] R.A. Taheri, A.H. Rezayan, F. Rahimi, J. Mohammadnejad, M. Kamali, Development of an immunosensor using oriented immobilized anti-OmpW for sensitive detection of *Vibrio cholerae* by surface plasmon resonance, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 484–488. doi:10.1016/j.bios.2016.07.006.
- [64] V.K. Rao, M.K. Sharma, A.K. Goel, L. Singh, K. Sekhar, Amperometric immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using disposable screen-printed electrodes, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1207–1211.
- [65] M.K. Sharma, A.K. Goel, L. Singh, V.K. Rao, Immunological Biosensor for Detection of *Vibrio cholerae* O1 in Environmental Water Samples, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 1155–1159. doi:10.1007/s11274-006-9156-y.

- [66] O. Laczka, M. Labbate, M. Doblin, Application of an ELISA-type amperometric assay to the detection of *Vibrio* species with screen-printed electrodes, *Anal. Methods*. 6 (2014) 2020–2023. doi:10.1039/C3AY42169D.
- [67] P.D. Tam, C.X. Thang, Label-free electrochemical immunosensor based on cerium oxide nanowires for *Vibrio cholerae* O1 detection, *Mater. Sci. Eng. C*. 58 (2016) 953–959. doi:10.1016/j.msec.2015.09.027.
- [68] Y. Sha, X. Zhang, W. Li, W. Wu, S. Wang, Z. Guo, J. Zhou, X. Su, A label-free multi-functionalized graphene oxide based electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater and seafood, *Talanta*. 147 (2016) 220–225. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.058.
- [69] A. Chua, C.Y. Yean, M. Ravichandran, B. Lim, P. Lalitha, A rapid DNA biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3825–3831. doi:10.1016/j.bios.2011.02.040.
- [70] Y. Wang, H. Li, D. Li, K. Li, Y. Wang, J. Xu, C. Ye, Multiple Cross Displacement Amplification Combined with Gold Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor for Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Front. Microbiol.* 7 (2016). doi:10.3389/fmicb.2016.02047.
- [71] C.-Y. Lee, G. Panicker, A.K. Bej, Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization, *J. Microbiol. Methods*. 53 (2003) 199–209. doi:10.1016/S0167-7012(03)00032-0.
- [72] J.P. Tosar, G. Brañas, J. Laíz, Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1205–1217. doi:10.1016/j.bios.2010.08.053.
- [73] K.-F. Low, A. Karimah, C.Y. Yean, A thermostabilized magnetosensing assay for DNA sequence-specific detection and quantification of *Vibrio cholerae*, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 38–44. doi:10.1016/j.bios.2013.03.004.
- [74] N. Nordin, N.A. Yusof, J. Abdullah, S. Radu, R. Hushiarian, Sensitive detection of multiple pathogens using a single DNA probe, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 398–405. doi:10.1016/j.bios.2016.06.077.

IV. Introduction aux travaux de thèse

Au vu de la littérature présentée dans cette première partie du manuscrit, plusieurs points importants se dégagent. Tout d'abord, il existe un réel besoin d'outils rapides, sensibles et peu coûteux afin de permettre la détection et la quantification des *Vibrio*. Les biocapteurs apparaissent comme des méthodes alternatives très prometteuses. Cependant, les biocapteurs développés pour la détection du genre *Vibrio* ciblent majoritairement les espèces *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* pathogènes de l'Homme, ainsi que quelques espèces à l'origine de maladies en aquaculture telles que *V. harveyi* ou *V. anguillarum*. Nous avons constaté, qu'à l'heure actuelle, un seul de ces outils permettait la détection du genre *Vibrio* dans son ensemble (Laczka *et al.*, 2014). De plus, aucun système de ce type n'existe pour l'étude spécifique des espèces appartenant au clade Splendidus, leur détection étant réalisée par qPCR selon la méthode mise au point par l'IFREMER (IFREMER, 2013).

Parmi les génocapteurs développés pour la détection des acides nucléiques de *Vibrio*, tous ciblent l'ADN donnant ainsi des informations sur la fraction totale des bactéries mais non sur la fraction active. De plus, la majorité d'entre eux repose sur la détection de produits de PCR et nécessite donc une étape d'amplification préalable, peu compatible avec une application des outils sur le terrain.

Les méthodes de préparation des échantillons sont certes adaptées en fonction du type de matrice et du type d'analyse envisagée (cellules entières ou acides nucléiques) mais aucune méthode standardisée n'existe rendant l'étape de préparation très variable d'une étude à une autre. De plus, la pureté et l'intégrité des extraits ne sont pas systématiquement contrôlée avant l'analyse, pouvant ainsi conduire à un biais des résultats obtenus.

Ainsi, dans ces travaux, nous proposons de développer des biocapteurs à ADN, et plus précisément des génocapteurs, pour la détection, d'une part du genre *Vibrio*, d'autre part des espèces de *Vibrio* appartenant spécifiquement au clade Splendidus. Afin de pouvoir cibler à la fois les fractions totales et actives de ces bactéries, nous souhaitons utiliser aussi bien des cibles ADN qu'ARN. Enfin, dans le but de pouvoir transférer les outils vers une plateforme microfluidique, aucune amplification par PCR n'est envisagée.

Afin de répondre à ces objectifs, mon travail a dans un premier temps consisté en des développements méthodologiques pour la mise au point de **génocapteurs**, en parallèle de

protocoles de **qPCR en temps réel**, utilisée comme méthode de référence, pour le suivi des *Vibrio*. Dans un second temps, les outils développés ont été appliqués à l'analyse d'acides nucléiques issus de **suspensions bactériennes pures** et d'**échantillons environnementaux** collectés en lagune de Salses-Leucate.

La présentation des résultats est ainsi organisée en 3 chapitres.

- Le premier chapitre décrit les **méthodes de préparation** des échantillons utilisés au cours de cette étude pour la validation des outils analytiques développés. Dans un premier temps, les méthodes envisagées pour l'extraction des acides nucléiques à partir de suspensions bactériennes pures sont présentées, puis le choix du site atelier ainsi que la stratégie d'échantillonnage mise en œuvre dans la lagune de Salses-Leucate afin de récolter et de traiter les échantillons environnementaux, sont détaillés.
- Le second chapitre concerne l'**optimisation de protocoles de qPCR en temps réel**, utilisée en tant que méthode de référence, pour la détection et la quantification du genre *Vibrio* dans son ensemble et des espèces appartenant au clade Splendidus.
- Le troisième chapitre présente le **développement des génocapteurs** pour le suivi des populations de *Vibrio* dans l'environnement aquatique. Deux formats d'hybridation différents ont été étudiés, couplés à des méthodes de détection optique et électrochimique.

Le manuscrit se termine par l'exposition des conclusions scientifiques de cette étude et des perspectives pouvant être envisagées afin d'optimiser les outils développés

Chapitre I :
Collecte et préparation des
échantillons de l'étude

I. Introduction

La clé d'une analyse fiable et précise réside grandement dans une préparation adaptée des échantillons. Cette étape, souvent négligée, apparaît pourtant essentielle afin d'exploiter tout le potentiel de la méthode de détection choisie.

Dans le cadre de notre étude, la détection des bactéries est réalisée grâce aux méthodes de qPCR en temps réel et de génocapteurs, toutes deux basées sur la détection d'acides nucléiques. L'ensemble des échantillons analysés, qu'il s'agisse de suspensions bactériennes pures ou d'échantillons environnementaux, doit ainsi subir une étape de lyse des cellules suivie de l'extraction des acides nucléiques. Afin de choisir une méthode d'extraction adaptée, plusieurs paramètres sont à prendre en considération. Il faut tout d'abord tenir compte du type d'échantillon et des applications prévues en aval, la méthode retenue devant permettre d'obtenir des suspensions d'acides nucléiques de bonne qualité, c'est-à-dire non dégradées et ne contenant pas d'impuretés, et en quantité suffisante afin de réaliser les analyses souhaitées. De plus, la simplicité et la rapidité de mise en œuvre ainsi que le coût de la technique sélectionnée sont d'autres critères à considérer. Dans le cas de la préparation des échantillons environnementaux, des étapes supplémentaires doivent souvent être réalisées en amont de l'extraction des acides nucléiques dans le but de :

- Réduire l'hétérogénéité des échantillons et par conséquent réduire les variations entre réplicats.
- Concentrer l'analyte cible afin d'être dans la gamme de détection de la méthode choisie.
- Éliminer les substances pouvant interférer avec l'analyse.

Dans une première partie, nous verrons ainsi quelles méthodes ont été envisagées pour l'extraction des acides nucléiques à partir de suspensions bactériennes pures et lesquelles semblent les plus adaptées à notre étude. Afin de réaliser une quantification précise et fiable des extraits d'acides nucléiques, une attention particulière a également été portée aux méthodes de dosage employées (**Figure I-1**).

Dans une seconde partie, nous présenterons la lagune de Salses-Leucate, site atelier au niveau duquel nous avons réalisé plusieurs prélèvements afin d'obtenir des échantillons environnementaux. Le choix de ce site est lié avec les mortalités d'huîtres qui y sont

régulièrement observées depuis 2008, et qui laissaient présager la présence d'espèces de *Vibrio* d'intérêt. La collecte des échantillons d'eau de lagune et de plancton et l'extraction de leurs acides nucléiques ensuite analysés à l'aide des outils développés dans les chapitres II et III, sont présentées en détails. En parallèle, une analyse des *Vibrio* cultivables a été effectuée sur ces mêmes échantillons environnementaux par des méthodes classiques de dénombrement sur milieu gélosé afin de déterminer quelles espèces sont rencontrées dans la lagune de Salses-Leucate (**Figure I-1**).

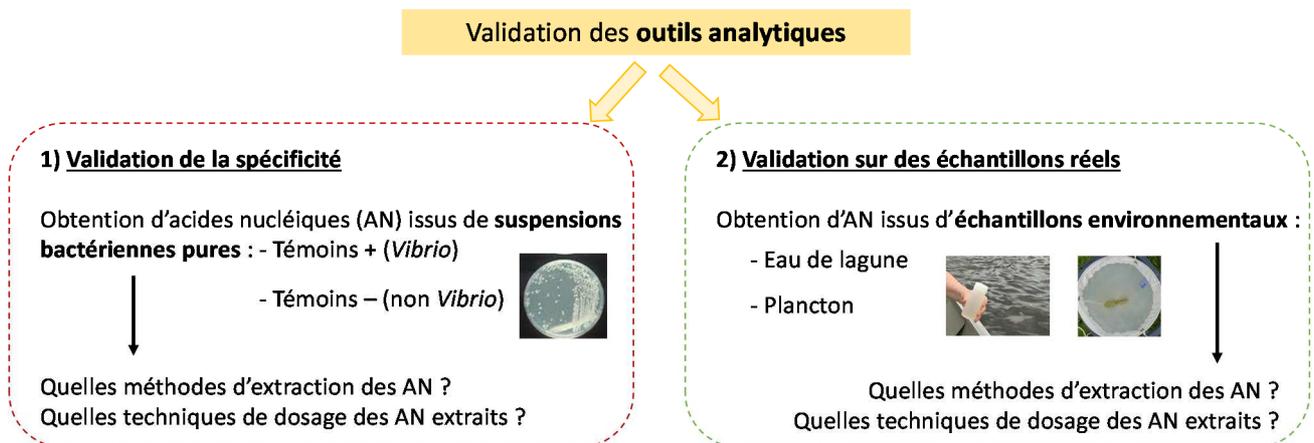


Figure I-1 : Schéma illustrant les objectifs du chapitre I.

II. Méthodes de préparation des acides nucléiques à partir de suspensions bactériennes pures

II.1. Partie expérimentale

II.1.1. Souches de référence et conditions de culture

La majorité des souches bactériennes utilisées dans cette étude proviennent des collections BBCC (Banyuls Bacterial Culture Collection, Banyuls-sur-Mer, France), ATCC (American-Type Culture Collection, Manassas, Etats-Unis) ou CIP (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France) (**Tableau I-1**). Seules *Citrobacter freundii* et *Pseudomonas pachastrellae*, non référencées, ont été isolées d'eaux douces au cours d'échantillonnages préalablement réalisés au laboratoire puis identifiées sur la base du séquençage de l'ARNr 16S. Les souches ont été cultivées une nuit à 25°C, en milieu Marine Broth (Difco™, Becton Dickinson and Co.) pour celles isolées de l'environnement marin et en milieu Tryptic Soy Broth

(Biokar Diagnostics) pour *C. freundii*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *P. pachastrellae*, et *Salmonella enterica*.

Tableau I-1 : Ensemble des souches bactériennes utilisées au cours de l'étude. * souches non référencées, isolées d'eau douce et identifiées sur la base du séquençage de l'ARNr 16S.

Souche	Référence	Souche	Référence
Vibrio		Non Vibrio	
<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	ATCC 35048	<i>Aeromonas media</i>	BBCC-LMA3
<i>V. aestuarianus francensis</i>	CIP 109791	<i>Alteromonas genovensis</i>	BBCC 994
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	<i>Alteromonas macleodii</i>	BBCC 60
<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	<i>Aquimarina latercula</i>	BBCC 1979
<i>V. cincinnatiensis</i>	CIP 104173	<i>Balneola vulgaris</i>	BBCC 118
<i>V. coralliilyticus</i>	CIP 107925	<i>Citrobacter freundii</i>	*
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108327	<i>Colwellia polaris</i>	BBCC 768
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108329	<i>Enterovibrio norvegicus</i>	BBCC 643
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108330	<i>Erythrobacter citreus</i>	BBCC 12
<i>V. fortis</i>	CIP 108196	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 104130
<i>V. gigantis</i>	CIP 108656	<i>Idiomarina maris</i>	BBCC 1037
<i>V. haliotocoli</i>	CIP 106283	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33512
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	<i>Maribacter stanieri</i>	BBCC 1960
<i>V. lentus</i>	CIP 107166	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	BBCC 1061
<i>V. littoralis</i>	CIP 109585	<i>Micrococcus luteus</i>	BBCC 960
<i>V. mediterranei</i>	ATCC 43341	<i>Microbacterium aquimaris</i>	BBCC 959
<i>V. metschnikovii</i>	CIP 69.14	<i>Photobacterium lutimaris</i>	BBCC 2019
<i>V. natrigens</i>	ATCC 14048	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	BBCC 990
<i>V. neptunius</i>	CIP 108274	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	*
<i>V. pomeroyi</i>	CIP 108273	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ATCC 43971
<i>V. rumoiensis</i>	CIP 109752	<i>Thalassobius gelatinovorvus</i>	BBCC 108
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125		
<i>V. splendidus</i>	CIP 107716		
<i>V. tapetis</i>	CIP 104856		
<i>V. tasmaniensis</i>	CIP 108272		
<i>V. tasmaniensis</i> (LGP32)	CIP 107715		

II.1.2. Méthodes d'extraction des acides nucléiques

II.1.2.1. Méthodes d'extraction de l'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique (ADNg) ont été réalisées à l'aide de trois kits commerciaux, DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen), PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation (MoBio) et Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), en suivant les instructions fournies par les fabricants (**Annexes I, II, III**).

Afin de relarguer les acides nucléiques dans le milieu, les kits DNeasy® Blood & Tissue et Wizard® Genomic DNA Purification comportent seulement une étape de lyse alcaline tandis que le kit PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation combine à la fois lyse alcaline et lyse mécanique *via* l'utilisation de microbilles de 0,1 mm de diamètre. Pour les 2 kits DNeasy®

Blood & Tissue et PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation, la purification des acides nucléiques repose ensuite sur leur adsorption spécifique à la surface de membranes en silice en présence d'une concentration élevée en sels chaotropes. Le troisième kit, Wizard® Genomic DNA Purification, permet quant à lui une extraction dite « en solution » au cours de laquelle l'ADN est récupéré après centrifugation puis précipité à l'isopropanol. L'ensemble de ces kits contiennent des étapes de digestion de l'ARN et d'élimination des protéines à l'aide de différentes solutions fournies par le fabricant.

Pour l'ensemble des méthodes présentées ci-dessus, les extractions ont été réalisées à partir de 1,5 mL de suspensions bactériennes initiales et permettent, après élution finale ou resuspension, d'obtenir des extraits d'ADN de 50 µL conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

II.1.2.2. Méthodes d'extraction des ARNs totaux

Afin d'optimiser les concentrations en ARNs ribosomiques (ARNr) ciblés par les génocapteurs développés, à savoir les ARNr 16S, une recharge ribosomique a été réalisée avant l'étape d'extraction. Pour cela, 1 mL de culture de nuit a été ajouté à 500 µL de milieu stérile puis la suspension a été incubée 4 h à 25°C. Les extractions des ARNs totaux ont ensuite été réalisées à l'aide de deux méthodes différentes.

La première technique utilisée est la méthode au TRI Reagent® très largement décrite dans la littérature pour de multiples applications en biologie moléculaire (Chomczynski et Sacchi, 1987 ; Chomczynski et Sacchi, 2006). La lyse des cellules résulte de l'addition de thiocyanate de guanidinium contenu dans le réactif TRI Reagent® puis les ARNs sont séparés des autres composants cellulaires par extraction liquide-liquide. Pour cette méthode, après centrifugation de 1,5 mL de culture à 8000×g pendant 5 min à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich). Le mélange est incubé 5 min à température ambiante afin de dissocier les complexes nucléo-protéiques puis centrifugé à 12000×g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 100 µL de 1-Bromo-3-chloropropane (BCP, Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Après une étape d'incubation de 10 min à température ambiante, le mélange est centrifugé à 12000×g pendant 15 min à 4 °C afin de parfaire l'installation de 3 phases. La phase surnageante, contenant l'ARN, est récupérée et déposée dans un nouveau tube puis 500 µL d'isopropanol (Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Après une incubation d'une nuit à -20°C, la solution est centrifugée à 12000×g pendant 8 min à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 1 mL

d'éthanol 75% (Sigma-Aldrich). Le mélange est centrifugé à 12000×g pendant 5 min à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 50 µL d'eau ultra pure.

Dans un second temps, des extractions des ARNs totaux ont été réalisées à l'aide du kit UltraClean® Microbial RNA Isolation (MoBio), basé sur le même principe que son analogue pour l'extraction d'ADN (PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation), en suivant les instructions fournies par le fabricant, à partir de 1,5 mL de suspension bactérienne initiale (**Annexe IV**). Après élution finale, des extraits d'ARN de 50 µL sont obtenus.

Les ARNs extraits à l'aide de deux méthodes ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

II.1.3. Analyse qualitative des acides nucléiques

II.1.3.1. Vérification de l'intégrité et de la pureté des extraits d'ADN

L'intégrité des échantillons d'ADN a été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. L'agarose (agarose low EEO, Sigma-Aldrich) est dissous à 1% dans du tampon de migration Tris-Borate-EDTA 1X (TBE 1X) (89 mmol.L⁻¹ Tris, 89 mmol.L⁻¹ acide borique, 2 mmol.L⁻¹ EDTA ; pH 8) à 95°C. Après refroidissement, un agent intercalant de l'ADN bicaténaire, le bromure d'éthidium (BET) est ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 µg.mL⁻¹. Afin d'estimer la taille des bandes d'ADN obtenues, 5 µL de marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (200 pb - 10 kb, Eurogentec) ou Quick Load DNA Ladder (500 pb - 10 kb, New England Biolabs) sont déposés. La migration est réalisée dans du tampon TBE 1X à l'aide de l'appareil PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad) à voltage constant de 90V pendant environ 1h puis les bandes sont révélées sous UV.

La pureté de ces mêmes échantillons a été estimée à l'aide des spectrophotomètres NanoVue™ Plus (GE Healthcare) et/ou NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) permettant de réaliser des mesures d'absorbance à 260, 280 et 230 nm sur des micro-volumes (< 2 µL). Le NanoVue™ Plus constitue un outil de mesure autonome tandis que le NanoDrop™ 1000 requiert l'utilisation d'un ordinateur afin de visualiser les résultats. Dans les deux cas, 1 µL d'extrait est déposé sur la surface inférieure du piédestal optique puis le programme d'intérêt est sélectionné afin de permettre au logiciel de calculer automatiquement la concentration en ADN ainsi que les ratios A 260/280 et A 260/230. Des solutions d'ADN pures possèdent un ratio A260/280 compris entre 1,8 et 2,0. Des valeurs inférieures suggèrent la présence de

contaminants tels que des protéines. Le ratio A260/230, compris entre 2 et 2,2 pour des suspensions d'acides nucléiques pures, permet quant à lui d'estimer une possible contamination par des réactifs utilisés lors de l'extraction.

II.1.3.2. Vérification de l'intégrité et de la pureté des extraits d'ARN

Dans un premier temps, l'intégrité des échantillons d'ARN a été contrôlée par électrophorèse après migration (90V, 1h) sur gel d'agarose 1,2% coloré au BET et révélation sous UV. Ensuite, l'analyse au Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano kit, Agilent Technologies) reposant sur une électrophorèse capillaire au sein de puces microfluidiques, couplée à une lecture en fluorescence, permet d'évaluer la pureté des échantillons d'ARN et de valider leur intégrité grâce au RIN (RNA integrity number), un indicateur de qualité des ARNs. Cette valeur, variant entre 1 et 10, est générée par l'algorithme du Bioanalyseur qui tient compte du ratio ARNr 23S/16S et de l'allure générale de l'électrophorégramme obtenu. Un RIN de 1 correspond à un ARN totalement dégradé alors qu'une valeur de 10 est observée pour un ARN de très bonne qualité. Les résultats fournis par cet outil sont visualisés sous la forme d'un électrophorégramme représentant l'émission de fluorescence en fonction du temps de migration des échantillons et de l'image du gel correspondant (**Figure I-2**). Pour chaque échantillon, la concentration en ARN total ainsi que le ratio ARNr 23S/16S et le RIN sont indiqués. Ainsi, le Bioanalyseur permet de coupler analyse qualitative et quantitative des acides nucléiques (**Annexe V**).

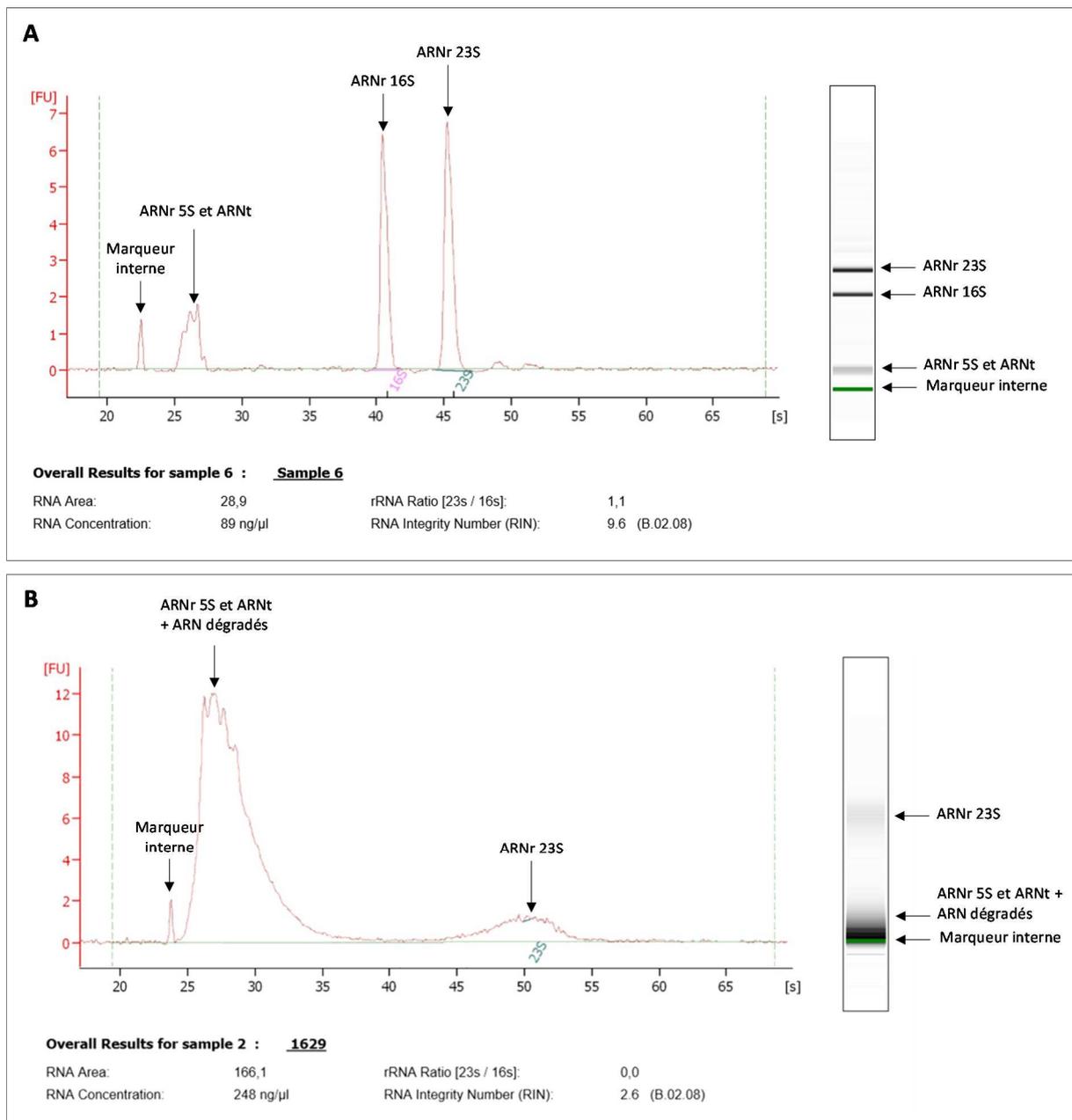


Figure I-2 : Exemple de résultats obtenus lors de l'analyse au Bioanalyseur **(A)** d'un extrait d'ARN intact et **(B)** d'un extrait d'ARN présentant une dégradation importante. Pour chacun, l'électrophorégramme généré est présenté à gauche et la migration sur gel correspondante à droite. La concentration en ARN total, le ratio ARNr 23S/16S et le RIN de l'échantillon sont indiqués en dessous.

II.1.4. Analyse quantitative des acides nucléiques

II.1.4.1. Dosage de l'ADNg

Différentes techniques ont été utilisées afin d'estimer la concentration des ADN extraits :

- par dosage direct à 260 nm à l'aide des spectrophotomètres de type NanoVue™ Plus ou NanoDrop™ 1000.

- par dosage indirect avec la méthode au PicoGreen® (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) basée sur une mesure de fluorescence en microplaques 96 puits après intercalation des molécules de PicoGreen® fluorescentes au sein des doubles brins d'ADN. Le standard (Lambda DNA standard) fourni dans le kit est dilué dans du tampon TE 1X afin d'obtenir des solutions de concentrations comprises entre 1 et 0,005 ng.µL⁻¹. 50 µL de standards ainsi obtenus et d'échantillons à doser (dilués ou non dans du TE 1X) sont déposés en triplicats dans les puits d'une microplaque 96 puits noire puis 50 µL du réactif PicoGreen® préalablement dilué 200 fois dans du tampon TE 1X sont ajoutés dans chacun des puits. Après 5 min d'incubation à température ambiante à l'obscurité, la lecture de fluorescence est réalisée à l'aide du Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 538 nm, respectivement.

II.1.4.2. Dosage des ARNs totaux

Pour les ARNs, la quantification a été réalisée *via* :

- un dosage direct par mesure spectrophotométrique à 260 nm à l'aide du NanoVue™ Plus.
- un dosage indirect au Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano kit, Agilent Technologies).

II.2. Résultats et discussion

II.2.1. Préparation de l'ADNg

Dans un premier temps, les extractions d'ADNg ont été réalisées, pour 21 souches de *Vibrio*, à l'aide du kit DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen. L'intégrité des extraits ainsi obtenus a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et leur pureté a été évaluée à l'aide du spectrophotomètre NanoVue™ (**Tableau I-2**). A l'exception de l'extrait d'ADNg issu de la souche *V. crassostreae* pour lequel un ratio A260/A280 de 1,9 est mesuré, tous les autres échantillons présentent un ratio supérieur ou égal à 2,1. Or, pour des extraits d'ADN provenant de suspensions pures, ce ratio devrait être compris entre 1,8 et 2,0 pour de l'ADN et entre 2,0 et 2,2 pour de l'ARN. Ainsi, les résultats obtenus semblent indiquer une

contamination des extraits d'ADNg par de l'ARN. Afin de renforcer cette hypothèse, l'ensemble des échantillons a ensuite été analysé à l'aide d'un second système de mesure spectrophotométrique, le NanoDrop™ basé sur le même principe de fonctionnement que le NanoVue™. Les ratios A260/A280 observés sont similaires à ceux mesurés à l'aide du NanoVue™ et sont au minimum de 2,1, confirmant ainsi les résultats précédemment obtenus.

Tableau I-2 : Ratio A260/280 mesuré à l'aide des spectrophotomètres NanoVue™ Plus et NanoDrop™ 1000 pour des échantillons d'ADN extraits à partir de 21 souches de *Vibrio* avec le kit DNeasy® Blood & Tissue.

Souche	Référence	Ratio A260/A280 NanoVue™ Plus	Ratio A260/A280 NanoDrop™ 1000
<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	ATCC 35048	2,2	2,2
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	2,2	2,1
<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	2,2	2,2
<i>V. cincinnatiensis</i>	CIP 104173	2,2	2,1
<i>V. coralliilyticus</i>	CIP 107925	2,1	2,1
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108327	1,9	2,1
<i>V. fortis</i>	CIP 108196	2,2	2,2
<i>V. gigantis</i>	CIP 108656	2,3	2,1
<i>V. halioticoli</i>	CIP 106283	2,2	2,1
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	2,2	2,1
<i>V. lentus</i>	CIP 107166	2,1	2,1
<i>V. litoralis</i>	CIP 109585	2,3	2,2
<i>V. mediterranei</i>	ATCC 43341	2,2	2,1
<i>V. metschnikovii</i>	CIP 69.14	2,2	2,1
<i>V. natrigens</i>	ATCC 14048	2,2	2,1
<i>V. neptunius</i>	CIP 108274	2,2	2,1
<i>V. rumoiensis</i>	CIP 109752	2,3	2,2
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125	2,3	2,2
<i>V. splendidus</i>	CIP 107716	2,3	2,1
<i>V. tapetis</i>	CIP 104856	2,3	2,2
<i>V. tasmaniensis</i>	CIP 108272	2,2	2,1

Les spectrophotomètres NanoVue™ et NanoDrop™ permettent non seulement d'estimer la pureté des extraits d'acides nucléiques mais aussi de les quantifier par mesure de l'absorbance à 260 nm (**Tableau I-3**). Cependant, à cette longueur d'onde, les contaminants et les acides nucléiques dégradés sont également détectés, entraînant une surestimation de la concentration réelle en acides nucléiques intacts dans l'échantillon. Par conséquent, afin de quantifier seulement l'ADN intact et de déterminer dans quelle mesure les résultats obtenus

avec des techniques spectrophotométriques divergent de ceux issus d'un dosage direct, un dosage au PicoGreen®, basé sur l'intercalation d'une molécule fluorescente au sein de la double hélice d'ADN a ensuite été envisagé. De manière générale, des concentrations en ADN en moyenne 10 à 40 fois plus faibles que celles mesurées avec le NanoVue™ et le NanoDrop™ sont obtenues, mettant ainsi en évidence les biais inhérents aux méthodes spectrophotométriques et confortant l'hypothèse de l'impureté des extraits d'ADN obtenus avec le kit DNeasy® Blood & Tissue.

Tableau I-3 : Concentrations en ADN déterminées à l'aide des spectrophotomètres NanoVue™ Plus et NanoDrop™ 1000 ainsi que par dosage au PicoGreen® pour les extraits obtenus à partir de 21 souches de *Vibrio* avec le kit DNeasy® Blood & Tissue.

Souche	Référence	Concentration ADN NanoVue™ Plus (ng.µL ⁻¹)	Concentration ADN NanoDrop™ 1000 (ng.µL ⁻¹)	Concentration ADN PicoGreen® (ng.µL ⁻¹)
<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	ATCC 35048	350,0	346,6	39,3
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	1022,0	962,7	108,9
<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	336,0	355,8	23,4
<i>V. cincinnatiensis</i>	CIP 104173	928,5	994,6	39,6
<i>V. coralliilyticus</i>	CIP 107925	654,0	773,8	41,9
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108327	529,0	732,6	58,4
<i>V. fortis</i>	CIP 108196	169,5	200,1	37,7
<i>V. gigantis</i>	CIP 108656	500,5	535,5	16,9
<i>V. haliotocoli</i>	CIP 106283	417,5	419,8	25,4
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	300,5	311,2	52,7
<i>V. lentus</i>	CIP 107166	133,5	142,5	27,9
<i>V. littoralis</i>	CIP 109585	1566,0	2170,5	49,1
<i>V. mediterranei</i>	ATCC 43341	318,0	340,2	21,2
<i>V. metschnikovii</i>	CIP 69.14	451,5	457,2	39,3
<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	464,5	502,4	76,7
<i>V. neptunius</i>	CIP 108274	785,5	752,7	44,5
<i>V. rumoiensis</i>	CIP 109752	1230,0	1287,1	10,5
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125	807,0	766,4	7,1
<i>V. splendidus</i>	CIP 107716	1140,0	1091,6	55,9
<i>V. tapetis</i>	CIP 104856	350,0	374,7	25,5
<i>V. tasmaniensis</i>	CIP 108272	146,5	164,0	25,5

Afin de confirmer la présence potentielle d'ARN dans les extraits obtenus avec le kit DNeasy® Blood & Tissue, ces mêmes échantillons ont ensuite été analysés à l'aide du kit ARN du Bioanalyseur (Agilent RNA 6000 Nano kit). De l'ARN a effectivement été détecté en quantité importante, avec une concentration moyenne de 435,0 ng.µL⁻¹ mesurée sur l'ensemble des 21 extraits. De plus, les résultats obtenus apparaissent très aléatoires d'un échantillon à l'autre avec des concentrations variant entre 16 et 1332 ng.µL⁻¹ d'ARN. La valeur moyenne du RIN de 2,6 ± 0,1 permet de conclure à une importante dégradation des ARNs

présents dans les extraits. Cette dégradation est visualisée sur les profils électrophorétiques générés par le Bioanalyseur au niveau desquels une migration des échantillons sous forme de trainées est constatée (**Figure I-3**).

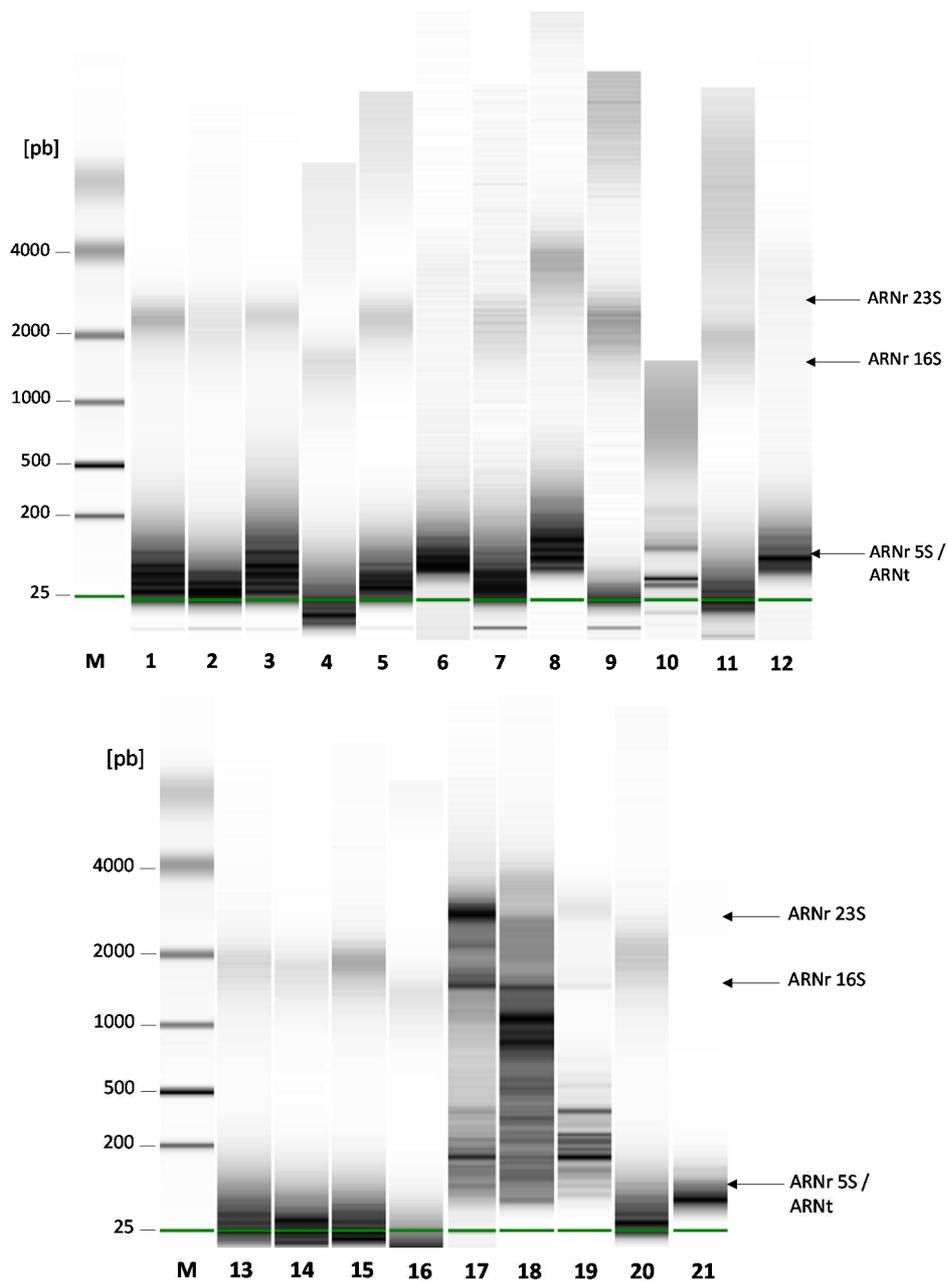


Figure I-3 : Exemple de profils électrophorétiques obtenus à l'aide du Bioanalyseur pour des échantillons d'ADN extraits avec le kit DNeasy® Blood & Tissue. La ligne verte représente l'indicateur de migration (marqueur interne RNA 6000 Nano Marker) intégré à l'ensemble des échantillons analysés. La piste notée **M** correspond au marqueur de poids moléculaire RNA 6000 Nano Ladder fourni dans le kit d'analyse RNA 6000 Nano du Bioanalyseur. Les autres pistes correspondent aux extraits d'ADN obtenus à partir des souches **(1)** *V. alginolyticus*; **(2)** *V. campbellii*; **(3)** *V. cincinnatiensis*; **(4)** *V. coralliilyticus*; **(5)** *V. crassostreae* CIP 108327; **(6)** *V. fortis*; **(7)** *V. gigantis*; **(8)** *V. harveyi*; **(9)** *V. lentus*; **(10)** *V. litoralis*; **(11)** *V. mediterranei* et **(12)** *V. aestuarianus aestuarianus*; **(13)** *V. haliotocoli*; **(14)** *V. metschnikovii*; **(15)** *V. natriegens*; **(16)** *V. neptunius*; **(17)** *V. rumoiensis*; **(18)** *V. splendidus* ATCC 33125; **(19)** *V. tapetis*; **(20)** *V. tasmaniensis* CIP 108272; **(21)** *V. splendidus* CIP 107716.

En conclusion, les extraits obtenus à l'aide du kit DNeasy® Blood & Tissue, contaminés par de l'ARN, peuvent convenir pour une application en qPCR au cours de laquelle seul l'ADN est amplifié, mais ne conviennent pas à une analyse en gènes où une distinction entre les cibles ADN et ARN doit être réalisée. Ainsi, 2 autres méthodes d'extraction de l'ADNg, à savoir les kits PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation et Wizard® Genomic DNA Purification ont été envisagées.

Dans un premier temps, 5 souches *V. aestuarianus francesis*, *V. gigantis*, *V. mediterranei*, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis* (CIP 108272) ont été sélectionnées. Pour une souche donnée, les extractions ont été réalisées à partir d'une même suspension avec les deux kits. La migration sur gel d'agarose 1% des extraits obtenus montre que ces deux kits conduisent à l'obtention d'ADNg à la fois intacts et purs (**Figure I-4**). En effet, seules des bandes correspondant à de l'ADNg sont observées, aucune migration sous forme de trainée, caractéristique d'un ADN dégradé ou de la présence d'ARN dégradé n'est constatée. Pour le kit PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation, la très faible intensité des bandes laisse supposer des concentrations en ADNg peu élevées.

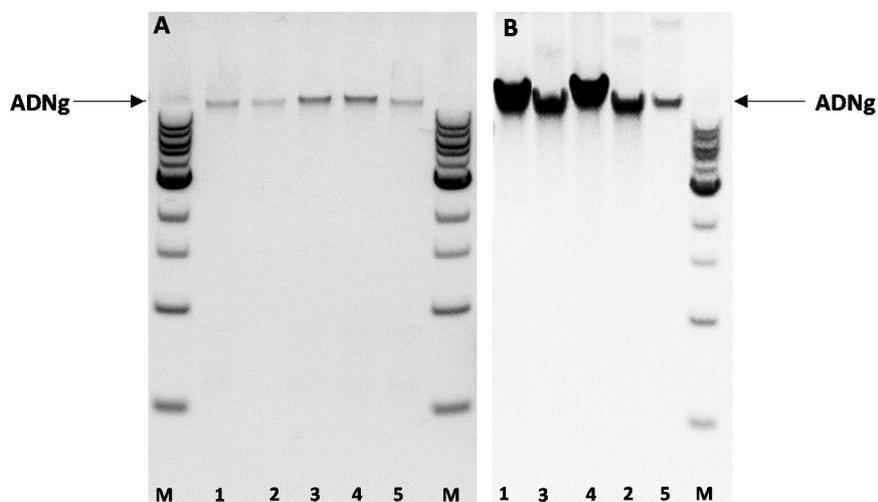


Figure I-4 : Migration sur gel d'agarose 1% d'extraits d'ADN obtenus avec (A) le kit PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation, et (B) le kit Wizard® Genomic DNA Purification. Les pistes M correspondent au marqueur de poids moléculaire Quick Load DNA Ladder (New England Biolabs, 500 pb - 10 kb). Les autres pistes correspondent aux extraits d'ADN (5 µL) issus des souches (1) *V. gigantis* ; (2) *V. tasmaniensis* CIP 108272 ; (3) *V. pomeroyi* ; (4) *V. mediterranei* ; (5) *V. aestuarianus francesis*.

Ces observations ont par la suite été confirmées par dosage des extraits d'ADNg au PicoGreen® (**Tableau I-4**). Pour une souche donnée, les extraits obtenus avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification présentent des concentrations 2 à 14 fois plus élevées que

ceux issus du kit PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation. Le temps d'extraction et le coût de revient estimés par échantillon étant équivalents pour ces deux techniques, le kit Wizard® Genomic DNA Purification apparaît comme le plus adapté pour l'extraction de l'ADNg à partir de suspensions de *Vibrio* pures et sera retenu comme méthode d'extraction des ADNg analysés en génocapteurs dans le chapitre III.

Tableau I-4 : Dosage au PicoGreen® des extraits d'ADN obtenus à l'aide des kits PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation et Wizard® Genomic DNA Purification pour 5 souches de *Vibrio*.

Souche	Concentration en ADN (ng.µL ⁻¹)	
	Kit PowerLyzer®	Kit Wizard® Genomic
<i>V. aestuarianus francesis</i>	3,3	7,8
<i>V. gigantis</i>	2,7	37,3
<i>V. mediterranei</i>	5,0	50,1
<i>V. pomeroyi</i>	2,1	23,8
<i>V. tasmaniensis</i>	3,3	17,6

II.2.2. Préparation des ARNs totaux

Les extractions des ARNs totaux ont dans un premier temps été réalisées, pour 20 souches de *Vibrio*, par la méthode au TRI Reagent®. La migration des échantillons sur gel d'agarose 1,2%, met en évidence l'intégrité et la pureté des extraits ainsi obtenus (**Figure I-5**). En effet, les bandes correspondant respectivement aux ARNr 23S et 16S se distinguent clairement et aucune migration sous forme de trainée n'est observée, indiquant une bonne intégrité des extraits. De plus, aucune contamination par de l'ADNg n'est constatée. Par la suite, l'analyse au Bioanalyseur a permis de confirmer la qualité des échantillons avec des RIN mesurés de 9,0 ± 0,5 et de quantifier les extraits présentant des concentrations en ARN total comprises entre 104 et 980 ng.µL⁻¹ suivant les échantillons. Ces concentrations sont suffisantes pour réaliser les tests de spécificité en génocapteurs nécessitant au minimum 5 ng.µL⁻¹ d'ARN.

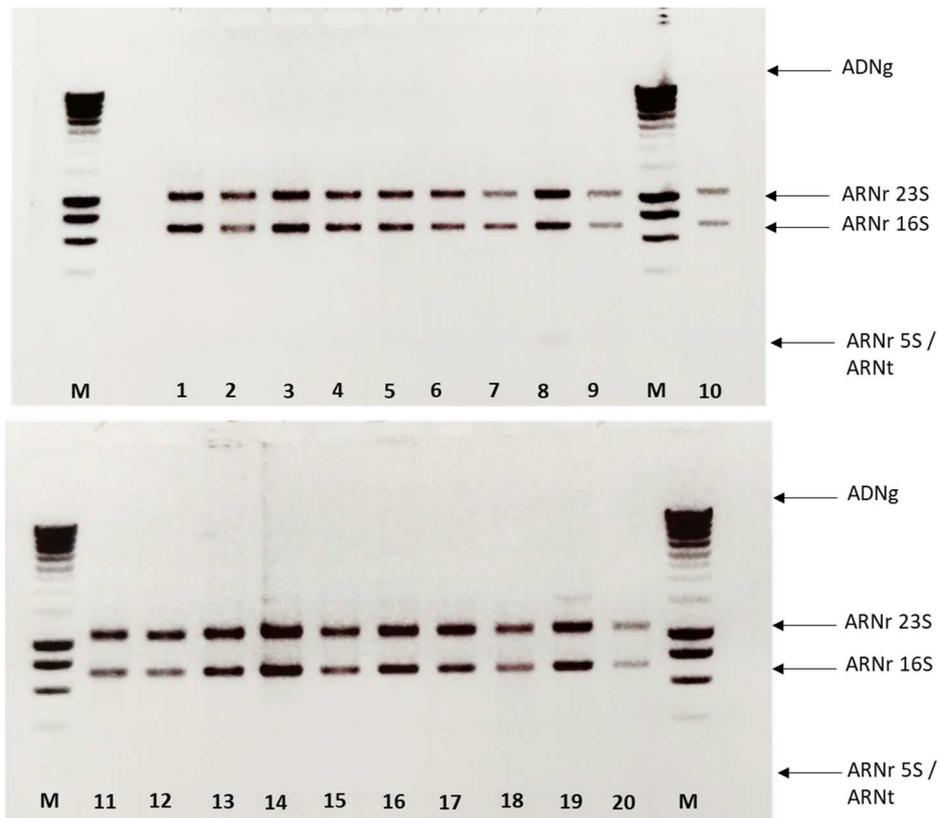


Figure I-5 : Migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits d'ARN total obtenus par la méthode au TRI Reagent®. Les pistes **M** correspondent au marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, 200-10 000 pb). Les autres pistes correspondent aux extraits d'ARN (5 µL) issus des souches **(1)** *V. natriagens*; **(2)** *V. neptunius*; **(3)** *V. pomeroyi*; **(4)** *V. rumoiensis* **(5)** *V. splendidus* ATCC33125; **(6)** *V. tasmaniensis* CIP 108272; **(7)** *V. aestuarianus aestuarianus*; **(8)** *V. tasmaniensis* CIP 107715; **(9)** *V. crassostreae* CIP 108329; **(10)** *V. mediterranei*; **(11)** *V. alginolyticus*; **(12)** *V. campbellii*; **(13)** *V. coralliilyticus*; **(14)** *V. crassostreae* CIP 108327; **(15)** *V. fortis*; **(16)** *V. gigantis*; **(17)** *V. haliotocoli*; **(18)** *V. harveyi*; **(19)** *V. lentus* et **(20)** *V. littoralis*.

Cependant, afin de permettre une extraction de l'ARN total plus rapide et surtout de s'affranchir de l'utilisation de réactifs chimiques hautement nocifs tels que le phénol, le kit UltraClean® Microbial RNA Isolation a été envisagé comme alternative à la méthode au TRI Reagent®. N'ayant aucun recul sur les performances de ce kit, nous avons choisi de réaliser des tests préliminaires sur seulement deux souches, *V. pomeroyi* et *V. tasmaniensis* (CIP 108272). La migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits obtenus avec les deux méthodes d'extraction met, une fois de plus, en évidence la pureté et l'intégrité des échantillons extraits avec la méthode au TRI Reagent® et révèlent la présence d'ADNg ainsi que d'ARN dégradé migrant sous la forme de trainées au sein des échantillons extraits avec le kit UltraClean® Microbial RNA Isolation (**Figure I-6**). Ainsi, comparé à ce kit, la méthode au TRI Reagent® reste la plus adaptée à notre utilisation et a donc été retenue afin d'extraire l'ensemble des ARNs totaux utilisés pour la réalisation des tests de spécificité en gécocapteurs (soit 21 souches de *Vibrio* et 10 souches de non *Vibrio*).

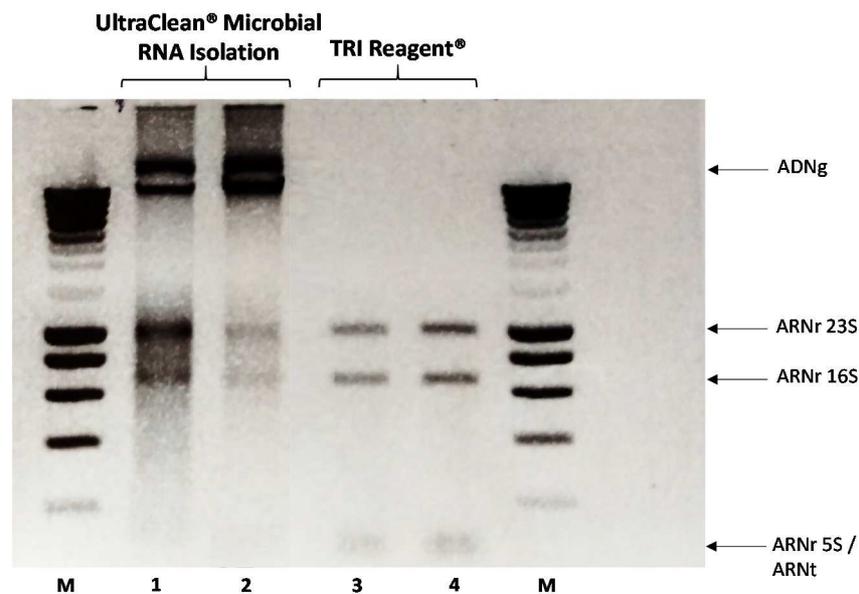


Figure I-6 : Migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits d'ARN total obtenus à l'aide du kit UltraClean® Microbial RNA Isolation et de la méthode au TRI Reagent®. Les pistes **M** correspondent au marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, 200-10 000 pb). Les autres pistes correspondent aux extraits d'ARN (5µL) issus des souches **(1)** et **(3)** *V. pomeroyi* ; **(2)** et **(4)** *V. tasmaniensis* CIP 108272.

Nous avons ensuite réalisé une première évaluation de la reproductibilité des extractions effectuées par la méthode au TRI Reagent®. Pour cela, l'ARN total a été extrait à partir de 3 cultures indépendantes, pour deux souches, *V. pomeroyi* et *V. splendidus* (ATCC 33125). L'analyse au Bioanalyseur des extraits montre que, pour une même souche, des profils similaires sont obtenus pour les 3 extraits (**Figure I-7**). Pour l'ensemble des échantillons, les bandes correspondant respectivement à l'ARNr 16S, 23S et les ARNr 5S/ARNt se distinguent clairement indiquant une bonne intégrité des extraits, confirmée par l'obtention de RIN supérieurs à 8. Pour la souche *V. pomeroyi*, les concentrations en ARN des 3 extraits sont respectivement de 119, 128 et 131 ng.µL⁻¹, d'où un coefficient de variation entre réplicats de 6,0%. Pour la souche *V. splendidus*, un coefficient de variation de 8,7% a été mesuré entre les 3 extraits présentant respectivement des concentrations en ARN de 109, 108 et 93 ng.µL⁻¹. Par conséquent, les résultats semblent confirmer la reproductibilité de la méthode d'extraction au TRI Reagent®.

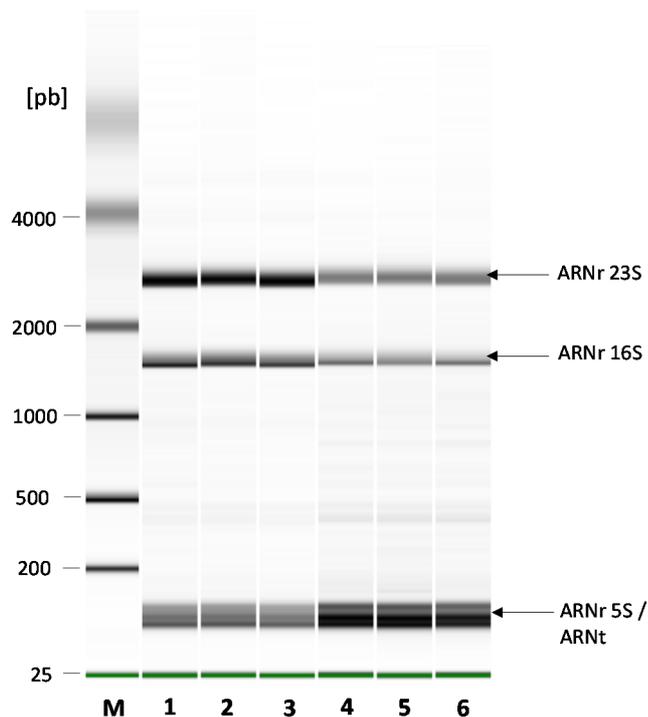


Figure I-7 : Profils électrophorétiques générés à l'aide du Bioanalyseur pour les extraits d'ARN obtenus avec la méthode au TRI-Reagent®. La ligne verte représente l'indicateur de migration (marqueur interne RNA 6000 Nano Marker) intégré à l'ensemble des échantillons analysés. La piste notée **M** correspond au marqueur de poids moléculaire RNA 6000 Nano Ladder fourni dans le kit d'analyse RNA 6000 Nano du Bioanalyseur. Les autres pistes correspondent aux extraits d'ARN obtenus à partir **(1), (2), (3)** de la souche *V. pomeroyi* et **(4), (5), (6)** de la souche *V. splendidus* ATCC 33125.

III. Collecte et préparation des échantillons environnementaux

L'objectif des collectes d'échantillons environnementaux réalisées dans la lagune de Salses-Leucate était double :

- Obtenir des extraits d'acides nucléiques issus d'échantillons environnementaux afin de pouvoir valider les outils de type qPCR en temps réel et génocapteurs développés au cours de la thèse.
- Valider la présence d'espèces d'intérêt dans les échantillons récoltés en effectuant pour la première fois un inventaire de la diversité des *Vibrio* cultivables rencontrées dans la lagune de Salses-Leucate au cours de la saison estivale, reconnue comme une saison marquée par les mortalités d'huîtres en Méditerranée. Aucune étude de *Vibrio* n'ayant été réalisée dans la lagune de Salses-Leucate, il était notamment nécessaire de déterminer si les espèces appartenant au clade Splendidus et notamment celles pathogènes des huîtres creuses, étaient présentes dans la lagune

et le cas échéant, d'en évaluer la proportion par rapport à la communauté totale de *Vibrio*.

III.1. Partie expérimentale

III.1.1. Caractéristiques du site atelier

L'étang de Salses-Leucate, situé à cheval entre les départements de l'Aude et des Pyrénées Orientales, s'étend sur plus de 5400 ha et se caractérise par une faible profondeur (maximum 3,5 m) et une eau saumâtre. Installée sur l'étang depuis plus de 50 ans, l'activité conchylicole concerne une trentaine d'entreprises faisant de Salses-Leucate la seconde zone de production conchylicole méditerranéenne après Thau.

Sur ce site, l'IFREMER contrôle la qualité microbiologique des coquillages, *via* le réseau REMI classant les zones surveillées en catégories de qualité A, B, ou C, sur la base du dénombrement d'*E. coli* pour 100 g de chair et de liquide inter-valvaire. Un suivi du phytoplancton et des phycotoxines est également effectué dans le cadre du réseau REPHY. De plus, ce site fait l'objet d'une surveillance régulière des paramètres physicochimiques par le syndicat mixte RIVAGE, situé à Leucate.

III.1.2. Collecte et traitement des échantillons

III.1.2.1. Collecte des échantillons

Les échantillons ont été récoltés le 2 mai, le 30 juin et le 15 juillet 2015 au niveau de 2 sites de prélèvement différents, depuis un bateau adapté aux faibles profondeurs de la lagune. Le premier point, se situant au nord de la lagune, et plus précisément au centre des tables ostréicoles (42° 52' 44'' N, 3° 01' 29'' E), est soumis aux influences maritimes *via* le grau de Leucate. Le second point, localisé au sud de la lagune (42° 50' 54'' N, 3° 00' 08'' E), est exposé aux eaux s'écoulant de la résurgence de Font Estramar ainsi qu'aux entrées maritimes du grau Saint-Ange (**Figure I-8**). Au niveau de chacun des sites, des échantillons d'eau et de plancton, organismes connus pour servir de support pour la formation de biofilms chez les *Vibrio*, ont été prélevés. La collecte des échantillons dans la lagune de Salses-Leucate a été effectuée en collaboration avec Léa Girard, étudiante en thèse au laboratoire LBBM.

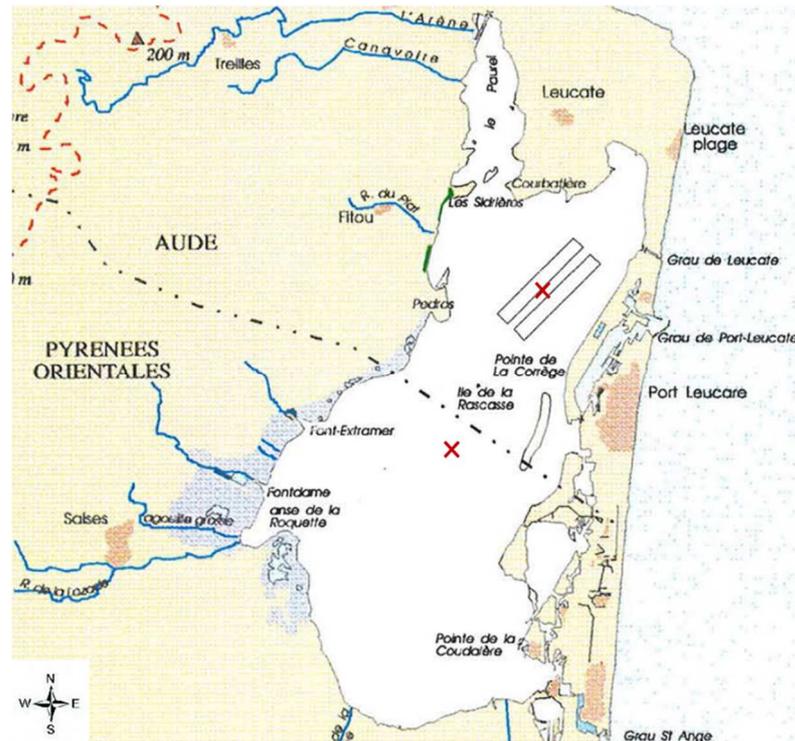


Figure I-8 : Cartographie de l'étang de Salses-Leucate (Ladagnous et Le Bec, 1997). Les deux points d'échantillonnage sont indiqués en rouge (X).

Les échantillons d'eau récoltés en sub-surface à l'aide de bidons en polycarbonate stériles ont été pré-filtrés sur des filets en nylon de 200 μm puis 65 μm afin d'éliminer les plus grosses particules. L'échantillonnage du plancton a été réalisé à l'aide d'un filet à plancton de 50 μm tracté en sub-surface par le bateau pendant une durée de 5 min et à une vitesse constante de 2 nœuds, permettant ainsi la concentration d'environ 25 m^3 d'eau. Le concentrât récupéré dans le collecteur du filet a ensuite été transféré dans des flacons opaques de 1 litre. L'ensemble des échantillons a été transporté à température ambiante jusqu'au laboratoire dans les 4h puis le traitement des échantillons a été réalisé dans la journée.

III.1.2.2. Ultrafiltration des échantillons d'eau

La faible concentration des bactéries dans l'eau de mer rendant souvent leur détection difficile, une étape de concentration a été réalisée à l'aide d'une méthode d'ultrafiltration appliquée avec succès pour la concentration de bactéries, virus et parasites, à partir d'importants volumes d'eau (Hill *et al.*, 2005 ; Hill *et al.*, 2007 ; Leskinen et Lim, 2008 ; Morales-Morales *et al.*, 2003). Vingt litres ont été concentrés à l'aide de la cartouche d'ultrafiltration Hemoflow HF80S (Fresenius) constituée d'un ensemble de fibres creuses de 25 cm de longueur et d'épaisseur de membrane de 40 μm . Cette cartouche possède une

surface de filtration effective de 1,8 m² et un seuil de coupure de 20 kDa. Afin de récupérer le concentrât, la cartouche a été éluée à l'aide d'une solution contenant 500 mL de filtrat, 0.01% de sodium hexametaphosphate (Sigma-Aldrich), 0.5% de Tween 80 (Sigma-Aldrich). Le nettoyage des cartouches avec successivement 5L d'acide chlorhydrique (Sigma-Aldrich) à 0,01 mol.L⁻¹, 5L de thiosulfate de sodium à 0,2% (Sigma-Aldrich) et 10 L d'eau ultra pure, permet leur réutilisation jusqu'à 100L d'eau filtrés.

III.1.2.3. Isolement et identification des *Vibrio* cultivables

Pour les échantillons d'eau, une gamme de dilutions décimales a été réalisée à partir d'une partie du concentrât puis 100 µL de chacune des suspensions ont été étalés en 5 exemplaires sur milieu gélosé thiosulfate - citrate - sels biliaires - saccharose (TCBS ; Biokar Diagnostics). Pour les échantillons de plancton, 100 µL de concentrât et de ses dilutions décimales provenant du filet à plancton ont été étalés directement en 5 exemplaires sur TCBS. Pour les deux types d'échantillons, après une incubation de 24h à 25°C, les colonies ont été dénombrées et 30 d'entre elles ont été isolées sur milieu Marine Agar de manière aléatoire à l'aide d'une grille numérotée. Après 24h d'incubation à 25°C, les colonies ainsi obtenues ont d'une part été cryoconservées dans du glycérol (Sigma-Aldrich, concentration finale 35%), d'autre part identifiées grâce au séquençage du gène *gyrB* (Le Roux *et al.*, 2004). Pour cela, une amplification PCR du gène *gyrB* a été réalisée directement sur des lysats obtenus après exposition des colonies à 3 cycles successifs de congélation dans l'azote liquide et décongélation par chauffage à 70°C. Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume final de 10 µL contenant 1 µL de tampon 10X, 1 µL de MgCl₂ 25 mmol.L⁻¹, 0,05 µL de Taq Platinum, 0,4 µL de dNTPs Master mix 20 mmol.L⁻¹, 0,2 µL de chacune des amorces UP1E et UP2AR à 10 µmol.L⁻¹, 6,15 µL d'eau ultra pure et 1 µL de lysat. Le programme thermique, appliqué à l'aide du thermocycleur Veriti® 96-Well Fast Thermal (Applied Biosystems), consistait en : une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, puis 40 cycles comprenant 30s de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à 60°C et 2 min d'élongation à 72°C puis une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits PCR ont ensuite été envoyés à la plateforme de séquençage de Macrogen (Corée). Les identifications ont été effectuées en se référant à la souche de référence la plus proche avec au minimum 98% de similarité.

III.1.2.4. Extractions des acides nucléiques pour la validation des outils analytiques

Les concentrâts d'eau et de plancton restants ont ensuite été subdivisés en fractions de 10 à 50 mL suivant les échantillons. Ces sous-échantillons ont été filtrés à l'aide de filtres en polycarbonate de porosité 0,4 µm. Les filtres ont été conservés soit (i) sans ajout de réactif à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ADN, soit (ii) dans 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) à -80°C en vue d'une extraction de l'ARN.

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir des filtres suivant la méthode de laboratoire au CTAB décrite par Murray et Thompson (1980). Les cellules ont été resuspendues dans 0,8 mL de tampon CTAB (2% CTAB; 100 mmol.L⁻¹ TrisHCl, pH=8 ; 20 mmol.L⁻¹ EDTA ; 1,4 mol.L⁻¹ NaCl ; 0.2% β-mercaptoethanol ; 0,1 mg.mL⁻¹ protéinase K) préalablement chauffé à 60°C. Les échantillons ont ensuite été incubés 1h à 60°C avant d'ajouter 0,8 mL de chloroforme/alcool isoamylique (24:1, v:v) et de les centrifuger à 14000×g pendant 10 min à 4 °C. La phase aqueuse, supérieure, a été transférée dans un nouveau tube et 1 µL de RNase A (Qiagen) a été ajouté avant d'incuber les échantillons 30 min à 37°C. La précipitation de l'ADN a été réalisée en incubant les échantillons additionnés de 0,6 mL d'isopropanol une nuit à -20°C. Les solutions ont ensuite été centrifugées 10 min à 14000×g et les culots obtenus ont été lavés deux fois avec de l'éthanol froid à 70%, avant d'être resuspendus dans 50 µL d'eau ultra pure. L'ensemble des réactifs provient de chez Sigma-Aldrich. Les ARNs ont été extraits par la méthode au TRI Reagent® décrite précédemment.

Après l'étape d'extraction, le dosage des acides nucléiques a été effectué au NanoVue™ Plus pour les ADNs et au Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent RNA 6000 Nano kit, Agilent Technologies) pour les ARNs.

III.2. Résultats et discussion

III.2.1. Extractions des acides nucléiques pour la validation des outils analytiques

Dans le protocole développé pour cette analyse, une concentration des échantillons a été réalisée à l'aide d'une cartouche d'ultrafiltration pour l'eau et d'un filet à plancton pour le plancton. Ces techniques permettent de filtrer d'importants volumes et favorisent ainsi la concentration des microorganismes présents à faible concentration et par conséquent augmentent les chances de les détecter. Cependant, ces techniques peuvent également conduire à la concentration d'inhibiteurs de PCR, tels que les polysaccharides (Schradler *et al.*,

2012) rencontrés aussi bien dans l'eau qu'au niveau de la paroi du phytoplancton. Au cours de cette étude, les acides nucléiques devant être analysés en qPCR ainsi qu'en gènes, il apparaît impératif d'utiliser des méthodes d'extraction permettant d'éliminer ces substances, afin de ne pas interférer avec les tests réalisés et de biaiser les résultats obtenus.

Dans ce but, pour l'extraction des ADNs, nous avons sélectionné la méthode au CTAB, largement décrite dans la littérature et appliquée avec succès à des échantillons, tels que les végétaux, contenant une proportion importante de polysaccharides (Murray et Thompson, 1980 ; Fang *et al.*, 1992 ; Porebski *et al.*, 1997). Les concentrations en ADN des extraits, dans un premier temps estimées au spectrophotomètre, varient entre 60 et 1700 ng.µL⁻¹ suivant les échantillons, ce qui est tout à fait satisfaisant pour réaliser une analyse en qPCR, nécessitant des concentrations en ADN comprises entre 4 et 10 ng.µL⁻¹. Par la suite, comme le montrent les résultats présentés dans le chapitre II, les extraits ont été analysés avec succès en qPCR *Vibrio* spp., aucune inhibition de la réaction d'amplification n'ayant été constatée.

Pour les extractions des ARNs totaux, la technique au TRI Reagent® adaptée à l'élimination des polysaccharides, a été retenue et appliquée à 16 échantillons environnementaux dont 8 échantillons d'eau et 8 de plancton. Un exemple de profil obtenu après migration sur gel d'agarose 1,2% de 9 extraits est donné **figure I-9**.

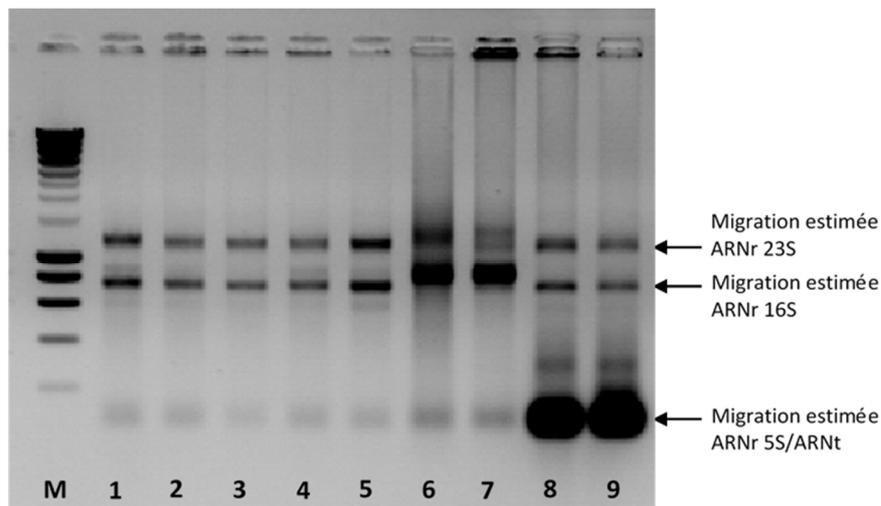


Figure I-9 : Migration sur gel d'agarose 1,2% d'ARN totaux extraits d'échantillons environnementaux par la méthode au TRI Reagent®. Les pistes M correspondent au marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec, 200-10 000 pb). Les autres pistes correspondent aux extraits d'ARN (5 µL) issus des échantillons collectés dans la lagune de Salses Leucate (**1**) eau juillet site sud ; (**2**) eau juillet site nord ; (**3**) eau juin site sud ; (**4**) eau juillet site sud 2 ; (**5**) eau juillet site nord 2 ; (**6**) plancton juillet site sud ; (**7**) plancton juillet site nord ; (**8**) plancton juin site sud ; (**9**) plancton juin site nord.

Les ARNs totaux correspondant non seulement à l'ARN des procaryotes mais également à celui des eucaryotes, il nous est impossible d'indiquer avec précision s'il s'agit d'ARNr 23S, 16S et 5S ou d'ARNr 28S, 18S et 5,8S. Ainsi, seule une indication de la migration estimée des ARNr 23S, 16S et 5S est donnée sur la figure I-9. Nous constatons une nette différence entre les extraits provenant des échantillons d'eau (pistes 1 à 5) et ceux issus des échantillons de plancton (pistes 6 à 9). Dans le premier cas, la migration des échantillons est très nette sans présence de trainées alors que dans le second cas, des migrations sous forme de trainées sont constatées. De plus, des bandes décalées par rapport à la migration estimée des ARNr 23S et 16S (pistes 6 et 7) ou des bandes de forte intensité se trouvant dans la zone de migration estimée des ARNr 5S et ARNt (pistes 8 et 9) pouvant également correspondre à des ARNr dégradés sont également observées. Ces observations peuvent s'expliquer par une abondance relative différente des bactéries dans les échantillons d'eau comparativement à ceux de plancton en raison des procédures de concentration utilisées. Par ailleurs, les extraits d'ARN totaux issus du plancton contiennent les ARNs des procaryotes attachés au plancton et les ARNs des eucaryotes planctoniques. Les analyses qualitative et quantitative des échantillons ont ensuite été réalisées au Bioanalyseur. Cela nous a permis de confirmer la présence d'ARNr 16S ciblé en génocapteurs. De plus, comme attendu avec des concentrations en ARN total inférieures à $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, les extraits issus des échantillons d'eau présentent des concentrations nettement plus faibles que ceux provenant des échantillons de plancton, avec des concentrations en ARN total variant entre 300 et $1400 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Des RIN compris entre 7 et 9,5 démontrent l'intégrité des ARNs totaux y compris ceux extraits à partir des échantillons de plancton. En conclusion, la méthode d'extraction au TRI Reagent® répond à nos attentes pour une application des ARNs extraits en génocapteurs nécessitant au minimum $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ d'ARN.

III.2.2. Isolement et identification des *Vibrio* cultivables

Les résultats des dénombrements sur TCBS sont présentés dans le **tableau I-5**. Les valeurs varient entre $1,68 \cdot 10^2$ et $1,86 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de concentrât pour les échantillons d'eau et entre $4,35 \cdot 10^3$ et $2,94 \cdot 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de concentrât pour ceux de plancton. Des méthodes de concentration différentes ont été employées lors de la collecte de l'eau et du plancton, par conséquent, il n'est pas possible de comparer les résultats obtenus pour une même date et un même site entre ces deux types d'échantillons.

Tableau I-5 : Valeurs de dénombrement sur TCBS pour l'ensemble des échantillons d'eau et de plancton collectés au cours de cette étude.

Date	Site	UFC.mL ⁻¹ de concentrat (moyenne ± écart type)	
		Eau	Plancton
Mai 2015	Nord	1,86 ± 1,08.10 ²	4,35 ± 0,64.10 ³
	Sud	1,68 ± 1,12.10 ²	1,68 ± 0,75.10 ⁴
Juin 2015	Nord	1,86 ± 0,44.10 ³	2,94 ± 0,66.10 ⁵
	Sud	1,37 ± 0,36.10 ³	9,74 ± 2,61.10 ⁴
Juillet 2015	Nord	7,41 ± 0,95.10 ²	1,17 ± 0,86.10 ⁴
	Sud	4,48 ± 0,67.10 ²	2,60 ± 0,49.10 ⁴

Au total, 360 souches ont été isolées lors des 3 collectes réalisées en mai, juin et juillet 2015, dans la lagune de Salses-Leucate (**Figure I-10**). 98,1% des souches ont pu être identifiées sur la base du séquençage du gène *gyrB* dont 10,3% possédant des séquences n'ayant permis qu'une identification au genre et non à l'espèce. Il s'agit toutes de souches de *Vibrio* (*Vibrio* spp.). 1,9% des souches ont présenté des séquences inexploitables pour une identification.

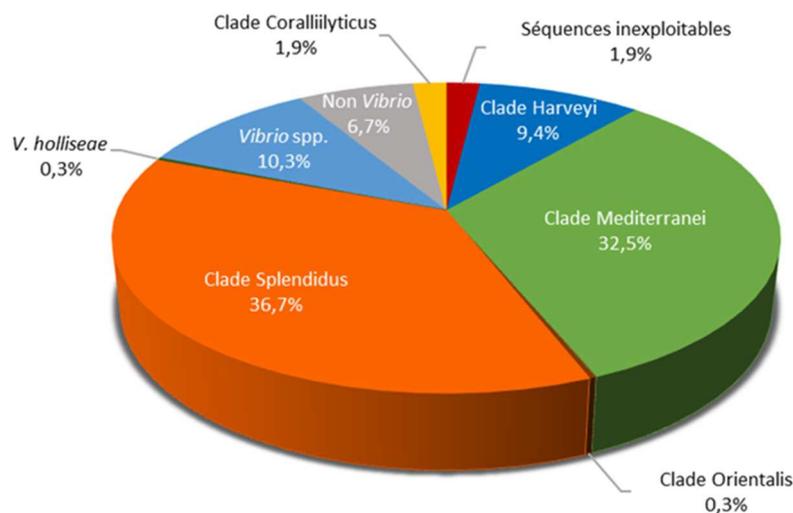


Figure I-10 : Ensemble des souches cultivables collectées dans la lagune de Salses-Leucate et isolées à 25°C (n=360). *Vibrio* spp. correspond aux souches pour lesquelles les séquences n'ont pas permis une identification à l'espèce.

Les *Vibrio* représentent 91,4% des souches isolées. Parmi celles-ci, les espèces appartenant au clade Splendidus dominent avec 36,7% des souches isolées suivies par le clade

Mediterranei représentant 32,5% des souches isolées. Nous retrouvons également, dans une moindre mesure, la présence des clades Harveyi (9,4%), Coralliilyticus (1,9%) et Orientalis (0,3%) ainsi que l'espèce *V. hollisae* n'appartenant à aucun clade (0,3%). Enfin, 6,7% des souches isolées ne correspondent pas à des *Vibrio* mais aux 3 genres bactériens *Photobacterium* spp. (3,1%), *Listonella* spp. (2,5%) et *Enterovibrio* spp. (1,1%) appartenant à la famille des *Vibrionaceae*.

L'analyse des souches de *Vibrio* cultivables isolées à 25°C par site et par date montre qu'au cours du mois de mai, 4 clades de *Vibrio* sont observés dont 3 pour le site sud et 4 pour le nord (**Figure I-11**). Les clades Splendidus, Mediterranei et Harveyi sont retrouvés au niveau des deux sites avec une dominance du clade Splendidus représentant 66,1% des souches de *Vibrio* isolées en mai. Le clade Orientalis n'est rencontré qu'au niveau du site nord. De plus, les souches n'ayant pas pu être identifiées à l'espèce représentent 5,4% des séquences de *Vibrio* pour le site sud et 8,9% pour le site nord.

En juin, 3 clades de *Vibrio* sont rencontrés et partagés entre les deux sites d'étude. En effet, au niveau du site sud, les clades Mediterranei, Splendidus et Harveyi représentent respectivement 65,0%, 18,3% et 8,3% des souches de *Vibrio* isolées à cette date. Pour le site nord, les résultats sont similaires à ceux observés au niveau du site sud puisque le clade Mediterranei correspond à 64,9% des séquences de *Vibrio*, le clade Splendidus 21,1% et le clade Harveyi 7,0%. Enfin, les souches n'ayant pas pu être identifiées à l'espèce représentent 15,0% des séquences de *Vibrio* dont 8,3% pour le site sud et 7,0% pour le site nord.

Au mois de juillet, 4 clades de *Vibrio* sont observés dont 3 pour le site sud et 4 au niveau du site nord. Les clades Harveyi, Mediterranei et Splendidus sont rencontrés au niveau des deux sites d'étude avec une dominance du clade Splendidus représentant 34,9% des souches de *Vibrio* isolées en juillet. Le clade Coralliilyticus n'est retrouvé qu'au niveau du site nord où il représente 14,6% des souches de *Vibrio* isolées. De plus, l'espèce *V. hollisae* n'est observée que pour le site sud au niveau duquel elle ne représente que 1,9% des souches. Les souches non identifiées à l'espèce constituent respectivement 13,5% et 27,1% des souches de *Vibrio* isolées pour les sites sud et nord.

De manière générale, peu de différences sont observées entre les deux sites de collecte pour une même date. En effet, la plupart des clades sont communs à ces deux sites,

notamment les clades majoritaires tels que Splendidus et Mediterranei représentant respectivement 40,2% et 34,5% des souches de *Vibrio* isolées au cours de l'ensemble des collectes. Les 34,5% du clade Mediterranei correspondent seulement à l'espèce *V. mediterranei* alors que les 40,2% du clade Splendidus se répartissent entre les espèces *V. crassostreae* (14,7%), *V. chagasii* (14,0%), *V. splendidus* (8,5%), *V. celticus* (2,4%), *V. tasmaniensis* (0,3%) et *V. gigantis* (0,3%).

Si nous nous intéressons maintenant à la variation de ces deux clades majoritaires au cours du temps, le clade Mediterranei est détecté lors des 3 collectes. Lors des mois de mai et de juillet, ce clade représente environ 19,0% des souches de *Vibrio* isolées, alors qu'en juin, un pic du nombre de souches appartenant à ce clade est observé, atteignant 65% des souches de *Vibrio* isolées. Le clade Splendidus est également rencontré aux 3 dates, et plus particulièrement au mois de mai au cours duquel il représente à lui seul 66% des souches de *Vibrio* isolées. Lors des mois suivant ce clade constitue 19,7% des souches de *Vibrio* isolées en juin et 34,9% en juillet.

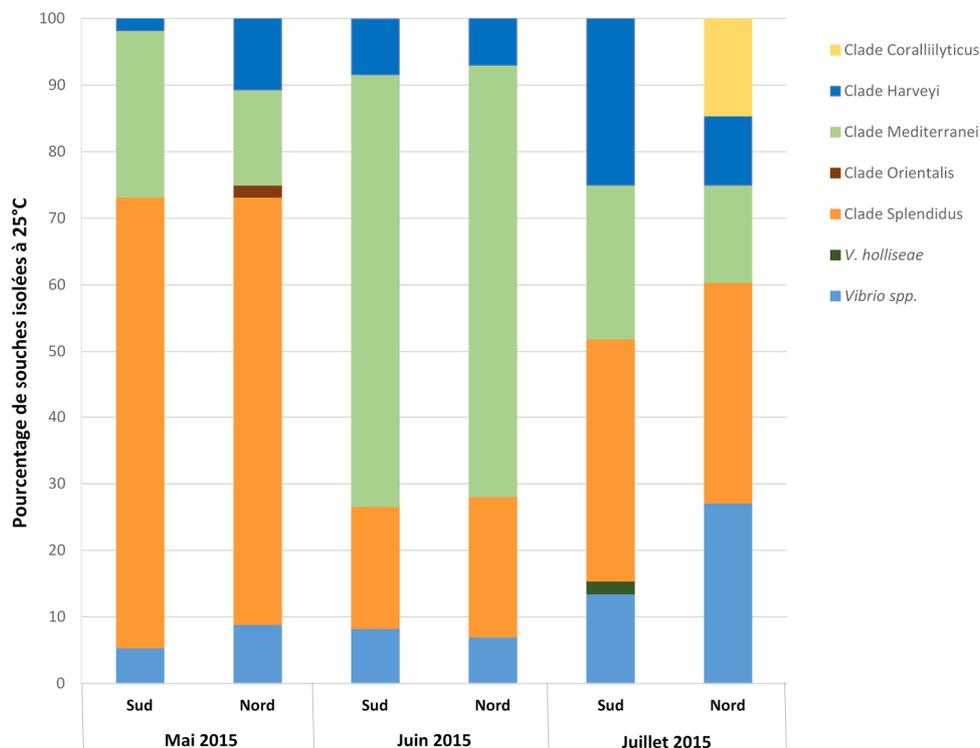


Figure I-11 : Diversité des souches de *Vibrio* cultivables isolées à 25°C, par site et par date (n=292). *Vibrio* spp. correspond aux souches pour lesquelles les séquences n'ont pas permis une identification à l'espèce.

IV. Conclusions du chapitre

Ce chapitre s'intéresse aux méthodes de préparation des échantillons utilisés au cours de cette étude pour la validation des outils analytiques développés. L'importance du choix des méthodes d'extraction et de quantification des acides nucléiques est mise en évidence.

La première partie concerne la préparation des acides nucléiques extraits de suspensions bactériennes pures. Les premiers extraits d'ADN obtenus à l'aide du kit DNeasy® Blood & Tissue bien qu'intacts, contenaient des ARNs. Cela n'était pas incompatible avec une utilisation des extraits en qPCR au cours de laquelle seule les ADN sont amplifiés mais les extraits pouvaient difficilement être appliqués à une analyse en génocapteurs. En effet, les sondes utilisées étant capables de reconnaître à la fois l'ADN et l'ARN, il nous aurait été impossible de distinguer ces deux types d'acides nucléiques. D'autres méthodes d'extraction de l'ADNg ont donc par la suite été envisagées. En ce qui concerne les extractions des ARNs totaux, la première technique testée, à savoir la méthode au TRI Reagent®, nous a permis d'obtenir des extraits intacts et purs. Cependant, cette méthode s'avérant fastidieuse et nécessitant l'utilisation de produits chimiques toxiques, nous avons choisi de tester le kit UltraClean® Microbial RNA Isolation, qui ne nous a cependant pas permis d'obtenir des ARNs totaux exempts d'ADNg. L'ensemble des essais réalisés avait pour but d'obtenir le plus rapidement possible des acides nucléiques de bonne qualité et en quantité suffisante pour valider les protocoles de qPCR et les génocapteurs développés. Cependant, suite à l'obtention de ces résultats préliminaires, il serait intéressant de poursuivre une étude comparative des méthodes d'extraction de l'ADNg et des ARNs totaux, en sélectionnant plusieurs techniques qui seront ensuite testées en parallèle sur un nombre déterminé de souches de *Vibrio*.

La seconde partie présente la préparation des échantillons environnementaux récoltés dans la lagune de Salses-Leucate. Les collectes réalisées entre mai et juillet 2015 ont permis de constituer un stock d'acides nucléiques environnementaux disponible pour la validation des outils analytiques développés au cours de la thèse. Les méthodes d'extraction envisagées, à savoir le TRI Reagent® pour l'ARN et le CTAB pour l'ADN, se sont révélées tout à fait adaptées afin d'obtenir des acides nucléiques intacts, purs et en quantité suffisante pour nos analyses. Afin de ne pas perdre d'échantillons, nous avons choisi d'utiliser des méthodes couramment utilisées avec succès au sein du laboratoire LBBM afin d'extraire les acides nucléiques à partir d'échantillons d'eau. Cependant, ces méthodes s'avérant coûteuses et fastidieuses, des kits

commerciaux dédiés à l'extraction d'acides nucléiques à partir de cette matrice pourraient être envisagés pour une utilisation en routine. La **figure I-12** présente les méthodes d'extraction et de dosage finalement retenues pour les acides nucléiques issus de suspensions bactériennes et d'échantillons environnementaux.

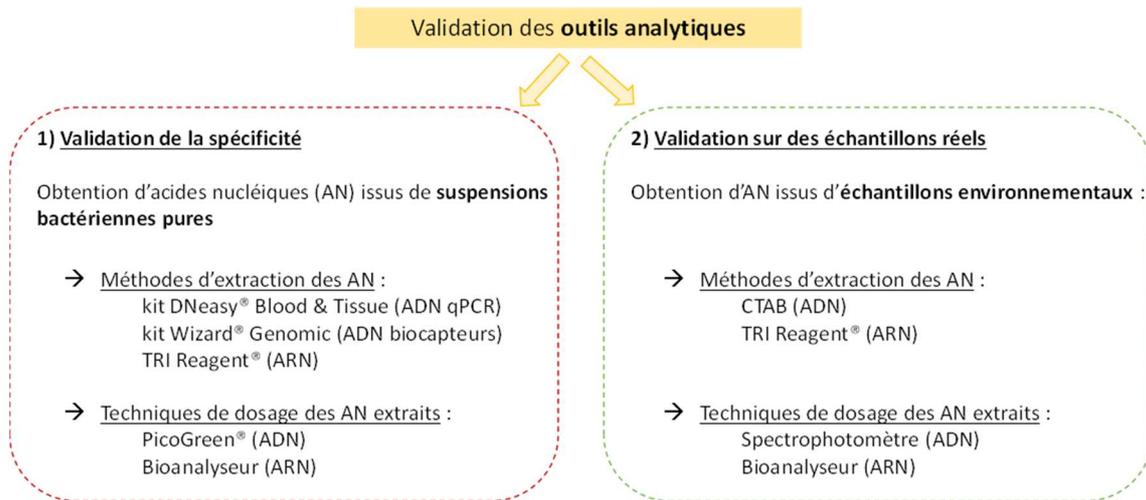


Figure I-12 : Méthodes d'extraction et de dosage des acides nucléiques issus de souches pures et d'échantillons environnementaux utilisés pour la validation des outils analytiques.

En parallèle, les échantillons récoltés dans la lagune de Salses-Leucate, ont été analysés par méthodes de culture classique sur milieu gélosé afin de valider la présence des *Vibrio* cultivables et de déterminer, après séquençage du gène *gyrB*, quelles souches sont retrouvées dans la lagune. Les résultats ainsi obtenus mettent en évidence une dominance des espèces appartenant au clade Splendidus sur la période de collecte ainsi qu'une similarité de la diversité des *Vibrio* rencontrés au niveau des deux sites d'échantillonnages choisis. Il apparaît important de rappeler que l'objectif était ici d'avoir une première idée des espèces de *Vibrio* présentes dans la lagune en période estivale et non de suivre l'évolution des populations de *Vibrio* cultivables au cours du temps. Dans ce but, d'autres campagnes ont été réalisées au cours de l'année 2016 dans le cadre de la thèse de Léa Girard et ont permis de confirmer les tendances observées au cours des 3 collectes de 2015.

Chapitre II :
Adaptation et performances analytiques de
méthodes de qPCR en temps réel pour la
détection et la quantification des *Vibrio*

I. Introduction

La qPCR en temps réel constitue aujourd'hui une méthode alternative aux approches culturales pour le suivi des pathogènes dans les environnements aquatiques. Cette technique repose sur le même principe qu'une PCR classique au cours de laquelle des fragments d'ADN sont amplifiés de manière cyclique grâce à une réaction enzymatique avec la *Taq* polymérase. Cependant, à la différence d'une PCR classique, la qPCR en temps réel permet également de suivre l'amplification de la cible au cours du temps grâce à un marqueur fluorescent. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle et son intensité est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Ainsi, plus le gène ciblé initialement présent dans l'échantillon est abondant, moins il faut de cycles, appelés cycles seuil (Ct) pour obtenir un signal fluorescent significativement supérieur au bruit de fond. Des standards de concentrations connues sont utilisés afin de générer une droite d'étalonnage représentant les valeurs de Ct obtenues en fonction du logarithme des concentrations connues en molécules cibles. En reportant le Ct obtenu pour un échantillon de concentration inconnue sur cette courbe, il est donc possible de quantifier le gène cible présent dans cet échantillon.

De nombreuses technologies existent aujourd'hui afin de quantifier les amplicons par qPCR en temps réel (Poitras et Houde, 2002 ; Tse et Capeau, 2003). La détection du genre *Vibrio* par cette technique repose, soit sur l'intercalation du fluorophore SybrGreen au sein des brins d'ADN bicaténaires, soit sur l'hydrolyse d'une sonde TaqMan (Zhou *et al.*, 2007 ; Tyagi *et al.*, 2009 ; Schikorski *et al.*, 2013 ; Robert-Pillot *et al.*, 2010 ; Bidault *et al.*, 2015). Dans le premier cas, le SybrGreen émet peu de fluorescence en solution puis sa fixation aux doubles brins d'ADN nouvellement formés lors de l'étape d'élongation conduit à l'augmentation de son émission de fluorescence qui est alors enregistrée (**Figure II-1 A**). Bien que peu coûteuse et sensible, cette technologie s'avère également peu spécifique et ne permet pas la différenciation des amplicons dans le cas d'une détection multi-cibles (Bustin *et al.*, 2000). De plus, la formation de dimères d'amorces peut conduire à des faux positifs ou à une quantification biaisée. Dans le second cas, la sonde TaqMan, spécifique d'une partie interne au fragment d'ADN amplifié est marquée en 5' par une molécule fluorescente appelée reporter et en 3' par une autre molécule fluorescente, le « quencher » (**Figure II-1 B**). Ce dernier absorbe dans un premier temps la fluorescence du reporter puis, au cours de la

réaction de polymérisation, l'hydrolyse de la sonde TaqMan par la *Taq* polymérase entraîne l'éloignement du reporter et du « quencher » d'où une émission de fluorescence plus importante. L'intensité du signal fluorescent est proportionnelle au nombre de copies générées au cours de la réaction de PCR. Cette technique plus coûteuse que l'utilisation d'agents intercalants, apparaît cependant, grâce à l'hybridation d'une sonde en plus de celle des amorces, plus spécifique et permet le multiplexage (Park *et al.*, 2013 ; Garrido-Maestu *et al.*, 2014).

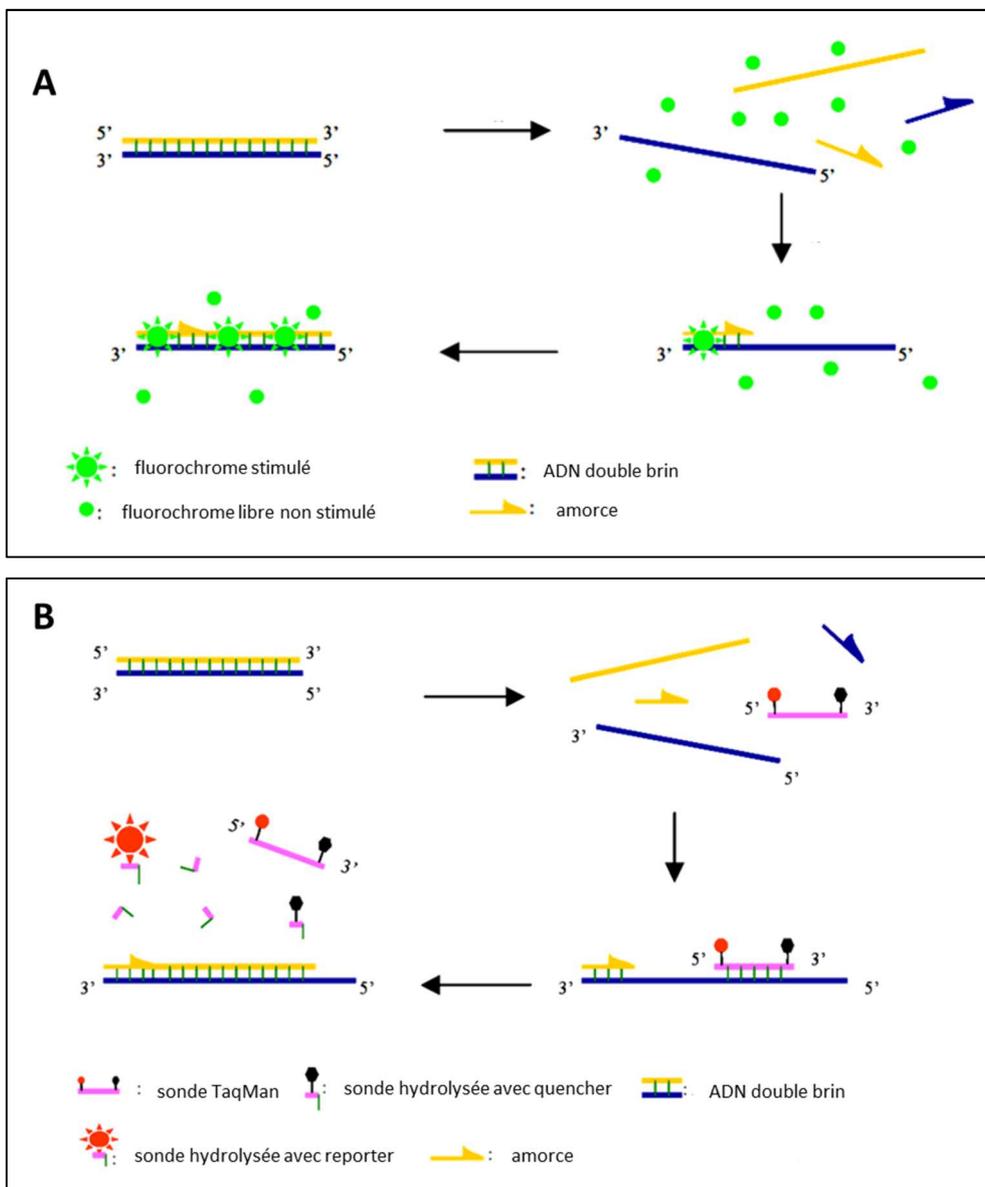


Figure II-1 : Principes de fonctionnement des qPCR (A) SybrGreen et (B) TaqMan (adapté de Poitras et Houde, 2002).

Nous avons ainsi choisi d'utiliser la technologie TaqMan afin d'adapter et d'évaluer les performances analytiques de deux protocoles de qPCR en temps réel pour l'analyse du genre *Vibrio* dans son ensemble et les espèces appartenant au clade Splendidus directement dans l'eau. Ces protocoles seront ensuite utilisés en tant que méthodes de référence pour le développement des outils analytiques de type génocapteurs décrits dans le chapitre III.

II. qPCR TaqMan pour la détection et la quantification du genre *Vibrio*

Les résultats obtenus pour l'analyse du genre *Vibrio* par qPCR TaqMan sont présentés sous la forme d'un article.

- **ARTICLE 2. DEVELOPMENT OF A TAQMAN REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF *VIBRIO* SPP. IN ENVIRONMENTAL SAMPLES**

E. Da-Silva, L. Barthelmebs et J. Baudart

A soumettre, Journal of Microbiological Methods

Cet article décrit le développement d'une méthode de qPCR en temps réel ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S pour la détection et la quantification des *Vibrio*. Dans un premier temps, une sonde TaqMan a spécialement été conçue pour ce travail. Après optimisation des paramètres expérimentaux, la méthode développée s'est avérée hautement répétable et reproductible, avec des coefficients de variation inférieurs à 5%, dans une gamme allant de $5,7 \cdot 10^2$ à $5,7 \cdot 10^6$ UG. μL^{-1} . De plus, des LD et LQ de 10 et 25 UG. μL^{-1} ont respectivement été obtenues, en suivant les recommandations fournies par la norme AFNOR XP T 90-471 initialement proposée pour la quantification de *Legionella* spp. par qPCR dans des échantillons d'eau. Une nette distinction a été établie entre les 25 souches de *Vibrio* et les 18 souches de non *Vibrio* testées démontrant ainsi la spécificité de la méthode développée. Le protocole a ensuite été appliqué avec succès à l'analyse d'échantillons réels (eau de mer et plancton). Les abondances estimées par qPCR ont été positivement corrélées aux abondances des *Vibrio* cultivables déterminées par dénombrement sur milieu TCBS. De plus, nous avons montré que cette méthode permet la détection et la quantification des *Vibrio* dans l'eau de mer même lorsqu'ils ne représentent qu'une faible fraction (0,00006%) de la communauté bactérienne totale.

**Real-time PCR assay optimization for the detection and quantification of
Vibrio spp. in environmental samples**

E. Da-Silva^{1,2*}, L. Barthelmebs^{1,2} and J. Baudart²

¹ Université Perpignan Via Domitia, Laboratoire Biocapteurs Analyses Environnement, Perpignan, France

² Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, Observatoire Océanologique, Banyuls/Mer, France

Running headline : *Vibrio* spp. real-time PCR assay

***Corresponding author :**

E. Da-Silva, Université Perpignan Via Domitia, Laboratoire Biocapteurs Analyses Environnement, F-66860 Perpignan, France.

E-mail : elise.dasilva@etudiant.univ-perp.fr

Abstract:

Aims: To optimize a TaqMan real-time PCR assay targeting the *16S rRNA* gene for *Vibrio* spp. detection and quantification in marine environmental samples.

Methods and Results: The specificity of the assay was validated using 25 *Vibrio* and 18 non *Vibrio* strains occurring with *Vibrio* in the environment. Analytical performances evaluation showed high repeatability and reproducibility of the assay (CV% < 5) as well as detection and quantification limits as low as 10 and 25 GU μl^{-1} , respectively. The real-time PCR was then successfully applied to the analysis of seawater and plankton samples. Total *Vibrio* abundances estimated by real-time PCR were positively correlated to the culturable fraction of *Vibrio* determined by plate counts. Relative abundance of culturable *Vibrio* to the total *Vibrio* was systematically higher for plankton (13.2-97.5%) than for seawater samples (4.4-27%). Furthermore, the assay allowed the detection and quantification of *Vibrio* in seawater even when these bacteria represent only a small fraction of the total bacterial population.

Conclusions: The real-time PCR assay described in this study provides a specific, sensitive and reproducible method for the detection and quantification of *Vibrio* species.

Significance and Impact of the Study: This study demonstrates that the proposed TaqMan PCR assay could constitute a useful method to accurately monitor co-occurring *Vibrio* populations in marine environments.

Keywords: TaqMan real-time PCR; *16S rRNA* gene; *Vibrio* spp.; quantitative detection; environmental monitoring.

Introduction

Vibrios are Gram-negative bacteria, belonging to the *Gammaproteobacteria*, that naturally occur in marine and estuarine ecosystems (Narracci *et al.*, 2014). These bacteria are found as free-living cells and also closely associated with marine animals, plankton, algae or abiotic surfaces (Heidelberg *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2009; Goecke *et al.*, 2010; Zettler *et al.*, 2013). Among the 133 *Vibrio* species described to date, twelve have been classified as human pathogens. *V. cholerae*, the etiological agent of cholera, as well as *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* involved in seafood poisoning, are responsible for most human infections (Tarr *et al.*, 2007). In the last decades, several studies have described the increase of human *Vibrio* infections worldwide, mainly in Africa and in Asia (World Health Organization), but also in USA. Between 2007 and 2014, the number of vibriosis, excluding toxigenic *V. cholerae*, had regularly increased from 549 to 1252 in this country. Eighty six per cent of the reported cases were located in the coastal states, with an illness peak during the summer months, and were classified for 50 to 60% as confirmed or probable foodborne disease, mainly due to oysters and other seafood intakes. The most frequently reported single species during this seven-year analysis was *V. parahaemolyticus*, isolated from 39 to 51% of patients. Then, *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* were isolated from 16 to 19% and 10 to 14% of the patients, respectively (COVIS, Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance). The emergence of *Vibrio* has also been recorded in several other areas with no previous incidence, even at high latitudes, such as in Sweden and Finland during summer 2014 (Eiler *et al.*, 2006; Baker-Austin *et al.*, 2012; Baker-Austin *et al.*, 2016). These observations seemed to be linked with an unprecedented high sea surface temperature. Similarly, a study conducted by Vezzulli *et al.* (2012) in the coastal North Sea, revealed that vibriosis prevalence could be correlated with elevated water temperature as a consequence of global climate change.

In addition to the incidence on human health, vibriosis is also an important bacterial disease for fish, shellfish and corals (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Frans *et al.*, 2011; Vezzulli *et al.*, 2015). With the rapid development of aquaculture, vibriosis has become a major cause of biological loss, to the extent of limiting the viability of this activity. In this context, *Vibrio* spp. monitoring appears to be necessary in order to understand *Vibrio* dynamics and thus to anticipate the risks linked to the presence of these bacteria in waters.

Vibrio detection in environmental samples was mainly assessed by traditional microbiological methods based on culture grown on differential agar media followed by colony counting. However, these approaches suffered from well-known and inherent drawbacks since they are time-consuming and require a delay of up to a week for species identification. Furthermore, they fail to detect cells induced by environmental stresses into a viable but-non culturable (VBNC) state widely described for *Vibrio* species (Baffone *et al.*, 2003; Binsztein *et al.*, 2004; Wong and Wang, 2004; Coutard *et al.*, 2005; Amel *et al.*, 2008).

To address these limitations, several culture-independent methods were proposed for the detection of *Vibrio* such as, PCR-based assays, offering rapidity, sensitivity and specificity. Real-time PCR have been developed for the detection and quantification, in environmental samples, of pathogenic *Vibrio* strains such as *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus*, *V. splendidus* and *V. aestuarianus* (Saulnier *et al.*, 2009; Pollock *et al.*, 2010; De Decker and Saulnier, 2011; Tall *et al.*, 2012; Garrido-Maestu *et al.*, 2014). However, in the environment, these pathogenic strains co-occur with diverse non-pathogenic *Vibrio* strains and understanding the factors leading to the increase of both populations appears essential. To the best of our knowledge, only one real-time PCR, based on the SybrGreen chemistry, has been proposed to the monitoring of total *Vibrio* populations in environmental samples (Vezzulli *et al.*, 2010; Vezzulli *et al.*, 2012; Siboni *et al.*, 2016). The SybrGreen PCR offers a cost-effective method but the Taqman chemistry is often preferred due to its high specificity.

Thus, in the present study, a real-time PCR assay based on the TaqMan chemistry was proposed for the specific detection of *Vibrio* spp. in environmental samples. Primers initially published by Thompson *et al.* (2004) were used and a TaqMan probe was designed in order to improve the specificity of the assay. All the PCR assay parameters were first optimized and the analytical performances evaluated. Then, the specificity of the assay was assessed using a panel of 43 environmental bacterial strains. Finally, the developed method was applied to the analysis of plankton and seawater samples. Results were compared to the abundances of culturable *Vibrio* and total bacteria.

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study were provided by several bacterial culture collections (Banyuls Bacterial Culture Collection (BBCC), American-Type Culture Collection (ATCC) and Collection de l'Institut Pasteur (CIP)). All environmental strains have been previously identified from the sequencing of the *16S rRNA* or *gyrB* genes. Marine strains were grown at 25°C in Marine Broth medium (MB; Difco™, Becton Dickinson and Co., Le Pont de Claix, France). *E. coli*, *Salmonella* and *Legionella* strains were cultivated in Tryptic Soy Broth (TSB; Biokar Diagnostics, Beauvais, France).

DNA extraction from pure cultures

Collection strains were grown overnight at 25°C in the appropriate medium. DNA extractions were performed using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, S.A., Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions and starting from 1.5 ml of an overnight culture. DNA concentration and purity were determined using a NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Europe, Germany). Then, samples were stored at -20°C until use as template for PCR amplification.

TaqMan probe and primers design

Detection of *Vibrio* spp. was performed using a TaqMan assay targeting a 121 bp region of the *16S rRNA* gene. The specificity of the primers 567F (5'-GGCGTAAAGCGCATGCAGGT-3') and 680R (5'-GAAATTCTACCCCCTCTACAG-3') previously described by Thompson *et al.* (2004) was checked *in silico* and the primers were selected for this study. A set of TaqMan probes was then designed using Primer Express software (Version 2.0, Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) and following guidelines including: (i) T_m range between 68 and 70°C, (ii) GC% range between 30 and a 80%, and (iii) length range between 15 and 30 pb, (iv) no G in 5', (v) more C than G and (vi) a maximum of 3 repeated G. The probe specificity was tested *in silico* using the Probe Match function of the RDP II program to calculate the coverage rates of probe sequences in the RDP database (**Table 1**). The probe 2 was selected as the best one due to its specificity for the members of the *Vibrio* genus. Nevertheless, the sequence of this probe matched with only 90 species out of the 105 *Vibrio* species present in the RDP II database.

Thus, to increase the coverage rate for the members of the *Vibrio* genus as well as fitting with all criteria of the TaqMan probe design, the probe 2 was manually modified into revprobe 2, corresponding to the reverse complement of the probe 2 with an ACTT tail at the 3' end. This probe was labelled at the 5' end with a 6-carboxy-fluorescein group (FAM) and at the 3' end with a 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA).

Table 1. Characteristics of probes designed in the study.

Probes	Sequence (5'- 3')	Length (bp)	Tm (°C)	GC %	RDP Probe Match coverage (%)		
					Non <i>Vibrio</i> hits on total bacteria sequences	<i>Vibrio</i> hits on total <i>Vibrio</i> sequences	Number of <i>Vibrio</i> species matching with the TaqMan probe *
Probe 1	ATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC	23	65.1	61	0.92	79.33	90
Probe 2	CAGATGTGAAAGCCCGGGGCTAAC	25	62.7	60	0.37	79.12	90
Probe 3	CGGGGCTCAACCTCGGAACTGC	22	65.2	68	0.32	29.30	27
RevProbe 2	CCCGGGCTTTCACATCTGACTT	22	59.0	54.5	0.27	80.42	98

* the coverage was measured exclusively from the isolated *Vibrio* Type strains (n = 105 species).

Real-time PCR amplification conditions

Experimental conditions as well as the composition of the PCR mix were first optimized. Then, PCR reactions were carried out in a 96 well PCR-96-LP-AB-C Axygen microplate (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) in a final volume of 10 µl per well containing 1 µl of 10X PCR buffer, 1 µl of MgCl₂ 35 mmol l⁻¹, 0.05 µl of Platinum® Taq DNA polymerase 5U µl⁻¹, all provided in Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), 0.4 µl of dNTPs Master mix 20 mmol l⁻¹ total (Eurogentec, Seraing, Belgium), 0.5 µl of 10 µmol l⁻¹ 567F and 680R primers (Microsynth AG, Balgach, Switzerland), 0.3 µl of 10 µmol l⁻¹ TaqMan probe (Microsynth AG), 0.8 µl of super ROX 15 µmol l⁻¹ (Biosearch Technologies, Novato, USA), 4.45 µl of molecular grade water (Sigma Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France) and 1 µl of template DNA in suitable concentration. Real-time PCR were performed in the StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) using the following thermocycling program: initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 45 cycles at 95°C for 2 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final elongation at 72°C for 7 min.

Analytical performances of the real-time PCR

Efficiency, repeatability and reproducibility determination

Vibrio splendidus (ATCC 33125) DNA was used as template to prepare PCR standards. PCR reactions were performed in a final volume of 20 μl containing 2 μl of 10X PCR buffer, 2 μl of MgCl_2 25 mmol l^{-1} , 0.1 μl of Taq Platinum, 0.8 μl of dNTPs Master mix 20 mmol l^{-1} total, 0.4 μl of 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 567F and 680R primers, 13.3 μl of molecular grade water and 1 μl of template DNA in suitable concentration. Amplifications were performed in a Veriti® 96-Well Fast Thermal cycler (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) and the following thermocycling program was applied: initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min and a final elongation step at 72°C for 7 min.

PCR products were checked on a 2% agarose gel before purification using QIAquick PCR purification kit (Qiagen, S.A., Courtaboeuf, France). DNA was quantified with the Agilent 2100 Bioanalyzer and concentrations were converted into genome units per microliter ($\text{GU } \mu\text{l}^{-1}$) with the online software of URI Genomics & Sequencing Center (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). DNA was ten-fold serially diluted in molecular grade water to obtain standards ranging from $5.7 \cdot 10^6 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ to $5.7 \cdot 10^2 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ and solutions were stored at -20°C until use.

For the calculation of PCR efficiency, standards were analyzed in triplicate. The StepOne™ Software automatically determined the Cycle Threshold (Ct) and calculates PCR efficiency using the following formula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (Nodstrom et al., 2007).

The intra-assay precision (repeatability) was assessed by calculating the coefficient of variation (CV) from each replicates of a run and the inter-assay precision (reproducibility) was evaluated by determining the CV of 7 combined runs.

Limits of detection and quantification evaluation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined according to the French AFNOR XP T 90-471 standard initially proposed for *Legionella* spp. quantification by real-time PCR in water samples (AFNOR, 2006).

The LOD corresponds to the lowest quantity of genomic DNA leading to the generation of a positive signal at a confidence level of minimum 90%. Ten independent dilution series

containing 25, 20, 15, 10 and 5 GU μl^{-1} were used to determine this limit. As soon as one measure of the 10 was negative for one level, the LOD was reached.

The LOQ corresponds to the smallest concentration of genomic DNA which can be quantitatively determined with fidelity and accuracy. In order to determine this limit, a solution containing 25 GU μl^{-1} was tested 6 times. Standard deviation of obtained Ct values was calculated. To validate a LOQ both fidelity and accuracy have to be verified. Fidelity is verified if $(2 \times t_{\text{Tab}} \times s) \leq 0.5 \log$, with t_{Tab} : Student table value (5% error risk ; k-1 degrees of freedom) ; s : standard deviation previously calculated. Accuracy is verified if $t_{\text{Cal}} < t_{\text{Tab}}$ with $t_{\text{Cal}} = (\log x - \bar{x}') / (s/\sqrt{k})$ with x: 25 GU of *Vibrio* spp.; x_i' : log of measured GU; \bar{x}' : x_i' average and k: number of repetitions = 6.

Specificity of primers and probe evaluation

The specificity of the assay was assessed using DNA extracted from pure cultures of 25 *Vibrio* and 18 non *Vibrio* strains closely related or which occur in the same environments as *Vibrio* (**Table 2**). For each strain, tests were performed in duplicates using 4-10 ng μl^{-1} of DNA template.

Environmental samples collection, processing and analysis

During June and July 2015, seawater and plankton samples were collected from two sites (North 42° 52' 44'' N, 3° 01' 29'' E and South 42° 50' 54'' N, 3° 00' 08'' E) located in a French northwestern Mediterranean lagoon (Leucate, Aude , France).

For the seawater samples, 20 liters of seawater were collected in sterile wide mouth bottles and then concentrated using a hollow fiber ultrafiltration cartridge (Hemoflow HF80S, Fresenius Medical Care, Fresnes, France) with a 20 kDa molecular weight cutoff. The cartridge was then back-flushed with 500 ml of elution buffer prepared with the ultra-filtrated water of the sampling site, 0.01% sodium hexametaphosphate and 0.5% Tween 80 to collect the concentrated seawater. Fifty milliliters of concentrate were then subsampled and filtered on 0.4- μm polycarbonate filters. DNA extraction was directly performed on those filters using the CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) method as following: cells were resuspended in 0.8 ml of pre-warmed (60°C) CTAB buffer (2% CTAB; 100 mmol l^{-1} ; TrisHCl, pH=8; 20 mmol l^{-1} EDTA; 1.4 mol l^{-1} NaCl; 0.2% β -mercaptoethanol; 0.1 mg ml^{-1} proteinase K). Samples were incubated at 60°C for 1 hour and 0.8 ml of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) solution were

added. Then, samples were centrifuged for 10 min at 14 000 *g*, 4°C and the aqueous phase was transferred to a clean tube. All reagents were purchased from Sigma Aldrich® (Saint-Quentin Fallavier, France). One microliter of RNase A (Qiagen, S.A., Courtaboeuf, France) was added and the solution was incubated for 30 min at 37°C. Then, 0.6 ml of isopropanol were added and samples were kept overnight at -20°C to allow DNA precipitation. Samples were centrifuged for 15 min at 14 000 *g*, 4°C. The supernatant was removed and the pellet washed twice with 70% cold ethanol. Samples were centrifuged again for 15 min at 14 000 *g*, 4°C, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 50 µl of molecular grade water.

For the plankton, samples collection was achieved by using a plankton net (50 µm) as described previously (Da-Silva *et al.*, 2017). The plankton from the net was collected in polyethylene buckets, and a total of 400 ml of concentrate was recovered after sampling. The concentrate was divided into subsamples of 10-50 ml, depending on the sample. Subsamples were then filtered on 0.4-µm polycarbonate filters and DNA extraction was performed as described above.

After extraction, DNA concentration and purity were determined using a NanoVue™ Plus Spectrophotometer and samples were stored at -20°C until use. The real-time PCR analysis were performed in triplicates from undiluted extracted DNA and ten-fold serial dilutions. Total *Vibrio* concentrations estimated by real-time PCR were expressed as number of cells per ml of sample by dividing the GU µl⁻¹ by a presumptive *16S rRNA* copy number in *Vibrio* bacteria, as previously reported (Acinas *et al.*, 2004; Vezzulli *et al.*, 2012). Based on the results referenced in the rRNA Operon Copy Number Database (last update May, 2017; Roller *et al.*, 2016) an average of 10.05 ribosomal operon copies was calculated for the *Vibrio* genus.

Culturable *Vibrio* were enumerated from each environmental samples as follow. The back-flushed concentrated seawater samples were ten-fold diluted in sterile artificial seawater and 100 µl of each dilution were spread on thiosulfate citrate-bile salts-sucrose (TCBS; Difco™, Becton Dickinson and Co., Le Pont de Claix, France) using five different plates for each dilution. Concentrated plankton samples were ten-fold serially diluted in artificial seawater and 100 µl of each dilution were spread on TCBS in triplicates. After 24 hours of incubation at 25°C, 30 colonies were randomly picked up for each sample and confirmed as *Vibrio* species by

sequencing of the *16S rRNA* or *gyrB* genes. The Pearson's test was used to assess the relationship between real-time PCR and plate counts.

Total bacteria concentrations were determined by flow cytometry (FCM) exclusively from seawater samples. Concentrated samples were preserved, in triplicates, in glutaraldehyde (1 % final concentration; Sigma Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France) and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until FCM analysis. The samples were later thawed at room temperature, stained with SYBR Green I (0.025 % final concentration; Molecular Probes Inc., Eugene, USA) for at least 15 min at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark and analyzed using the FACSCanto II™ flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA) equipped with a 488 nm, 15 mW argon laser. Total bacteria cells were detected on a plot of green fluorescence (515–545 nm) versus right angle light scatter (SSC), using the green fluorescence as threshold parameter. Fluorescent beads (Fluoresbrite YG Microspheres, calibration grade 1.00 μm ; Polysciences, Inc., Warrington, USA) were added to each sample analyzed to normalize SSC and green fluorescence.

Results

Real-time PCR assay performances

A standard curve was generated for each run. The standard curves were linear over a 5 log dilution series (**Figure 1**). The PCR efficiencies, measured from 8 different standard curves, were calculated from the slope of each standard curve. The slope ranged between -3.298 to -3.558, corresponding to PCR efficiencies between 104.0 and 90.9 % with R^2 values ranging from 0.999 to 1.000.

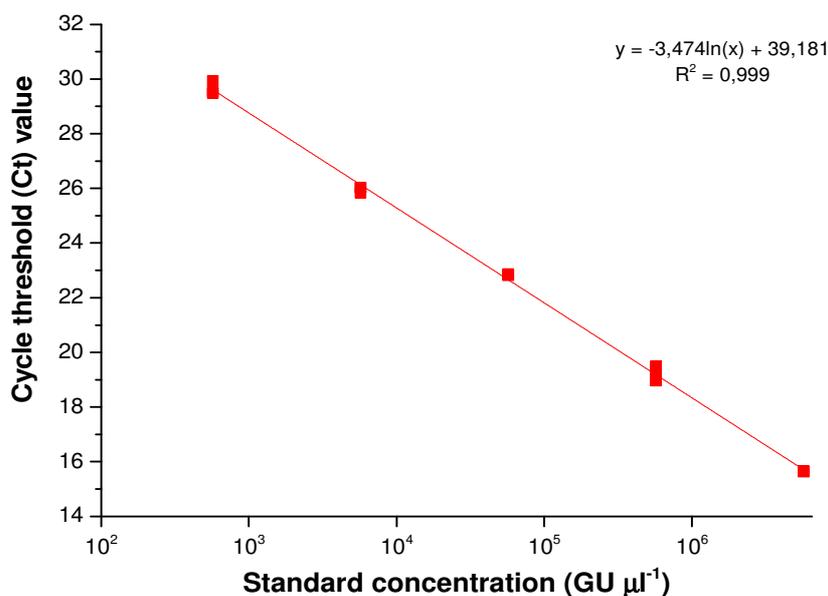


Figure 1. Standard curve delineating threshold value obtained for several standard concentrations ranging from $5.7 \times 10^2 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ and $5.7 \times 10^6 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$. Values obtained for each triplicate are shown.

The repeatability and the reproducibility of the real-time PCR were excellent with coefficients of variation below 1.5% and 4.5%, respectively. The standards quantification was highly reproducible in the range of $5.7 \times 10^2 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ to $5.7 \times 10^6 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$.

Ten independent dilutions ranging from 5 to $25 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ were analyzed to determine the LOD. In order to be accepted as LOD, at least 90% of positive results has to be obtained. For the dilutions at 25, 20, 15 and $10 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$, the totality of the 10 tested samples were detected by real-time PCR. However, only 6 of the 10 tested samples gave a positive signal for the dilution at $5 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ (**Figure S1**). Thus, the value of $10 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ was determined as the LOD.

To validate a LOQ, both fidelity and accuracy have to be verified. These two parameters have been validated when the assay was performed using $25 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$ (**Table S1**). Thus, the LOQ has been set as $25 \text{ GU } \mu\text{l}^{-1}$.

Specificity of the real-time PCR assay

The specificity of the assay was assessed using 25 *Vibrio* strains belonging to nine different clades (*Anguillarum*, *Harveyi*, *Cholerae*, *Coralliilyticus*, *Splendidus*, *Halioticoli*, *Mediterranei*, *Rumoiensis* clades and one orphan clade) and 18 strains belonging to other bacterial genera (**Table 2**). For the inclusivity test, all *Vibrio* strains were successfully detected with Ct values lower than 20. Extremes values of 10.37 to 19.16 were obtained for *V. fortis* and *V.*

alginoliticus, respectively. For the exclusivity test, a faint signal with Ct values higher than 30 was observed for 12 non *Vibrio* strains and no signal was measured for the 6 other strains. These results indicate that the developed real-time PCR was highly specific and showed 100% concordance for the tested *Vibrio* species.

Table 2. Strains used for the specificity evaluation of the *Vibrio* spp. real-time PCR assay.

Strain	Strain origin	TaqMan PCR	Average Ct value
Inclusivity			
<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	ATCC 35048	+	14.76
<i>V. aestuarianus francensis</i>	CIP 109791	+	16.16
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	+	10.37
<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	+	14.59
<i>V. cincinnatiensis</i>	CIP 104173	+	13.03
<i>V. coralliilyticus</i>	CIP 107925	+	14.15
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108327	+	14.57
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108329	+	15.33
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108330	+	18.08
<i>V. fortis</i>	CIP 108196	+	19.16
<i>V. gigantis</i>	CIP 108656	+	12.14
<i>V. haliotocoli</i>	CIP 106283	+	16.37
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	+	14.54
<i>V. lentus</i>	CIP 107166	+	11.66
<i>V. mediterranei</i>	ATCC 43341	+	11.73
<i>V. metschnikovii</i>	CIP 69.14	+	11.64
<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	+	12.98
<i>V. neptunius</i>	CIP 108274	+	10.51
<i>V. pomeroyi</i>	CIP 108273	+	13.82
<i>V. rumoiensis</i>	CIP 109752	+	14.83
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125	+	16.68
<i>V. splendidus</i>	CIP 107716	+	15.52
<i>V. tapetis</i>	CIP 104856	+	10.56
<i>V. tasmaniensis</i>	CIP 108272	+	13.54
<i>V. tasmaniensis</i> (LGP32)	CIP 107715	+	17.93
Exclusivity			
<i>Aeromonas media</i>	BBCC-LMA3	-	31.41
<i>Alteromonas genovensis</i>	BBCC 994	-	> 44
<i>Alteromonas macleodii</i>	BBCC 60	-	>44
<i>Aquimarina latercula</i>	BBCC 1979	-	30.63
<i>Balneola vulgaris</i>	BBCC 118	-	35.13
<i>Colwellia polaris</i>	BBCC 768	-	35.65
<i>Enterovibrio norvegicus</i>	BBCC 643	-	31.82
<i>Erythrobacter citreus</i>	BBCC 12	-	36.74
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 104130	-	> 44
<i>Idiomarina maris</i>	BBCC 1037	-	35.63
<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC 33512	-	> 44
<i>Maribacter stanieri</i>	BBCC 1960	-	32.26
<i>Marinobacter lipolyticus</i>	BBCC 1061	-	37.48
<i>Micrococcus luteus</i>	BBCC 960	-	> 44
<i>Microbacterium aquimaris</i>	BBCC 959	-	35.30
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	BBCC 990	-	> 44
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 43971	-	> 44
<i>Thalassobius gelatinovor</i>	BBCC 108	-	30.51

- negative for real-time PCR ; + positive for real-time PCR.

***Vibrio* spp. detection and quantification in environmental samples**

All the environmental samples were real-time PCR positive, with PCR counts ranging from $2.74 \pm 0.45 \times 10^4$ to $2.23 \pm 0.20 \times 10^7$ GU ml⁻¹ (**Table 3**).

Table 3. *Vibrio* spp. quantification from plankton and seawater samples by real-time PCR. GU per ml of concentrate were measured from undiluted, 10 and 100-fold diluted DNA samples.

Sample	Sampling site and date	GU μl ⁻¹ of diluted DNA samples (Mean ± standard deviation)			GU ml ⁻¹ of concentrate (Mean ± standard deviation)
		Undiluted	10-fold	100-fold	
Plankton1	North 06.30.2015	nd	1.20 ± 0.06 10 ⁶	1.04 ± 0.04 10 ⁵	2.23 ± 0.20 10 ⁷
Seawater1	North 06.30.2015	2.66 ± 0.68 10 ⁵	4.28 ± 0.34 10 ⁴	4.17 ± 0.62 10 ³	4.21 ± 0.45 10 ⁵
Plankton2	North 07.15.2015	nd	1.95 ± 0.17 10 ⁴	1.39 ± 0.16 10 ³	1.66 ± 0.34 10 ⁵
Seawater2	North 07.15.2015	2.03 ± 0.34 10 ⁴	3.11 ± 0.35 10 ³	2.40 ± 0.05 10 ²	2.74 ± 0.45 10 ⁴
Plankton3	South 07.15.2015	nd	1.31 ± 0.07 10 ⁴	1.37 ± 0.08 10 ³	2.67 ± 0.15 10 ⁵
Seawater3	South 07.15.2015	2.74 ± 0.24 10 ⁴	3.58 ± 0.31 10 ³	2.58 ± 0.36 10 ²	3.06 ± 0.61 10 ⁴

nd : not determined.

The repeatability of the real-time PCR count was dependent on the dilution of the extracted DNA. The undiluted samples showed the higher CV values ranging from 8.7 and 25.5%. For the 10-fold and 100-fold diluted samples, CV were systematically below 15%. *Vibrio* abundances estimated from real-time PCR counts were positively correlated to the plate counts (**Figure 2**). As demonstrated by the Pearson's test (n = 6, r = 0.890, p = 0.017, α = 0.05), this correlation was excellent for the studied period.

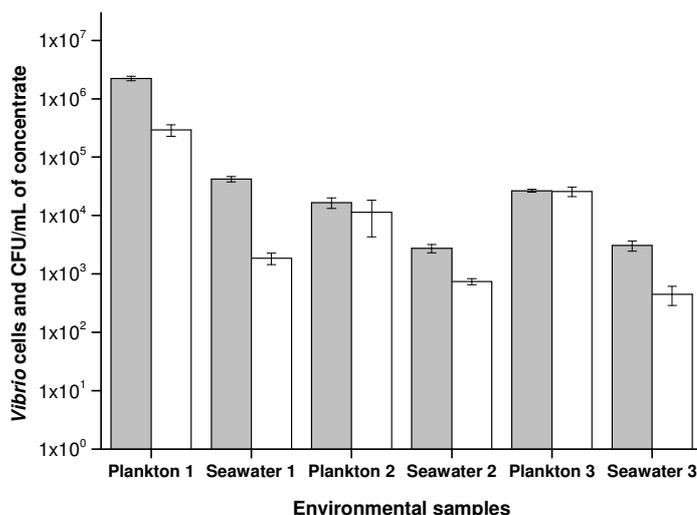


Figure 2. *Vibrio* enumeration from plankton and seawater samples. *Vibrio* abundances were estimated by real-time PCR* (grey bars) and by plate count (white bars). * The total *Vibrio* abundance was estimated from real-time PCR counts and calculated by division of the GU abundance by 10.05 as described in the material and method section.

For a same sampling location and date, the relative abundance of culturable *Vibrio* to the total *Vibrio* bacteria was systematically higher in plankton (13.2-97.5%) than in the seawater samples (4.4-27%) (**Table 4**). Finally, we showed that the quantitative sensitivity of the PCR assay was excellent in seawater leading to the detection and quantification of total *Vibrio* population corresponding as low as 0.00006% of the total bacteria (**Table 4**).

Table 4. Relative abundances of culturable *Vibrio* to the total *Vibrio* and of total *Vibrio* to the total bacteria.

Sample	Relative abundance of culturable <i>Vibrio</i> to the total <i>Vibrio</i> * (%)	Relative abundance of total <i>Vibrio</i> to the total bacteria (%)
Plankton1	13.2	nd
Seawater1	4.4	0.0009
Plankton2	68.6	nd
Seawater2	27.0	0.00006
Plankton3	97.5	nd
Seawater3	14.6	0.00008

nd : not determined.

Discussion

Vibrio abundance and diversity exhibit complex spatial and temporal fluctuations. These dynamics have been correlated with environmental factors variability, temperature and salinity being the main drivers (Huq *et al.*, 2005; Oberbeckmann *et al.*, 2012). Several studies have recently underlined the impact of climate change on *Vibrio* emergence worldwide (Paz *et al.*, 2007; Baker-Austin *et al.*, 2012; Vezzulli *et al.*, 2016). Most of these studies have focused on *Vibrio* species inducing public health hazard such as *V. cholerae* or *V. vulnificus*. However, in order to prevent vibriosis risks, a better understanding of co-occurring *Vibrio* population dynamics in the environment is needed.

In the present study, we developed a TaqMan real-time PCR assay targeting the *16S rRNA* gene to quantify *Vibrio* species in environmental samples. The assay showed an excellent repeatability and reproducibility (CV < 1.5 and 4.5%, respectively) in a range of $5.7 \cdot 10^2$ GU μl^{-1} to $5.7 \cdot 10^6$ GU μl^{-1} and a specificity of 100% for a large diversity of *Vibrio* species.

The real-time PCR assay was then applied to the analysis of environmental samples and estimated *Vibrio* cells were compared to the *Vibrio* plate counts. Before analysis, plankton and seawater samples were concentrated using a plankton net and a hollow fiber ultrafiltration cartridge, respectively. This kind of cartridge was already applied for the detection of rare pathogens in freshwater and seawater requiring the analysis of large volumes of water (Marcheggiani *et al.*, 2015; Baudart *et al.*, 2017). Nevertheless, detection of targets was performed directly by microarray without enzyme amplification by PCR. The concentration of samples by plankton net as well by ultrafiltration, can result in the concentration of PCR inhibitors such as polysaccharides in extracted DNA (Schrader *et al.*, 2012) and lead to an underestimation of PCR counts. However, in the present study, no PCR inhibition was detected from all the concentrated samples, since expected real-time PCR counts from the dilution series of DNA has been met. These observations could be explained by the use of the CTAB DNA extraction method which is, in presence of high salt concentration, efficient to remove polysaccharide content from samples (Murray and Thompson, 1980; Fang *et al.*, 1992; Porebski *et al.*, 1997). Compared to conventional culture approach, real-time PCR offered the advantage to detect both culturable and unculturable cells, leading to a better estimation of the total *Vibrio* concentration in the assessed samples (Maynaud *et al.*, 2016).

In conclusion, the efficiency of the sample preparation method described in this study as well as the sensibility, specificity and reproducibility of the developed TaqMan PCR assay may be particularly suitable for *Vibrio* populations monitoring in various marine environments.

Acknowledgments:

Elise Da-Silva is very grateful to the University of Perpignan Via Domitia, France for its financial support through Doctoral School 305. We are thankful to the cytométrie-imagerie (http://www.obs-banyuls.fr/fr/ressources/plateforme_cytometrie_imagerie2.html) and the BIO2MAR (<http://bio2mar.obs-banyuls.fr/fr/index.html>) platforms of the Oceanographic Observatory of Banyuls-sur-mer for the flow cytometry analysis and for the access to the real-time PCR instrumentation. We particularly thank Nyree West, Claire Fayet and Laurent Intertaglia for providing technical support.

Conflict of interest: no conflict of interest declared

Supplementary data:

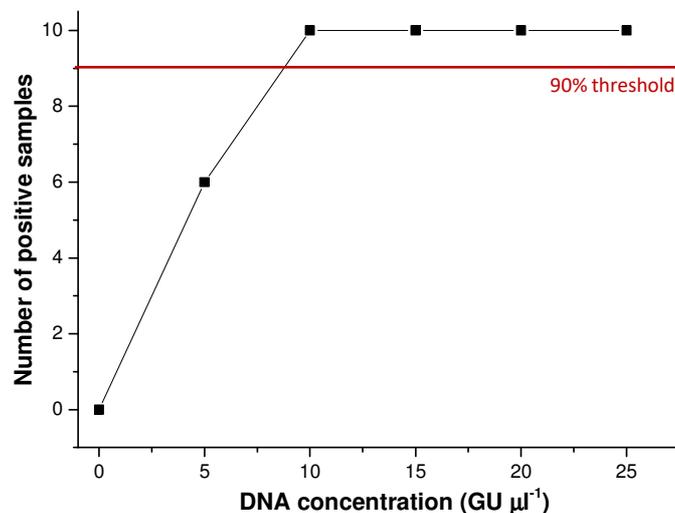


Figure S1. Limit of detection determination. Limit of detection corresponds to the lowest quantity of genomic DNA giving at least 90% of positive samples.

Table S1. Limit of quantification determination using 6 replicates of a solution containing 25 GU μl^{-1} .

Replicates	Quantity (GU μl^{-1})	Quantity log (x_i')
1	16.07	1.21
2	22.23	1.34
3	28.26	1.45
4	21.79	1.34
5	16.76	1.22
6	24.31	1.39

References

- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. and Polz, M. F. (2004) Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *J Bacteriol* **186**, 2629–2635.
- AFNOR Association Française de Normalisation (2006) Détection et quantification des *Legionella* et /ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaine (PCR) – Norme XP T90-471. La Plaine Saint Denis, France: AFNOR.
- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J.G., Pérez-Castañeda, R., Palacios-Monzón, A., Trujillo-Rodríguez, T. and de la Cruz-Hernández, N.I. (2010) Pathogenicity and Infection Route of *Vibrio parahaemolyticus* in American White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquacult Soc* **41**, 464-470.
- Amel, B. K.-N., Amine, B. and Amina, B. (2008) Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiol Res* **163**, 323–328.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L. and Donelli, G. (2003) Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int J Food Microbiol* **89**, 31–39.

- Baker-Austin, C., Trinanes, J. A., Taylor, N. G. H., Hartnell, R., Siitonen, A. and Martinez-Urtaza, J. (2012) Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat Clim Change* **3**, 73–77.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J. A., Salmenlinna, S., Löfdahl, M., Siitonen, A., Taylor, N. G. and Martinez-Urtaza, J. (2016) Heat Wave–Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emerg Infect Dis* **22**, 1216–20.
- Baudart, J., Guillebault, D., Mielke, E., Meyer, T., Tandon, N., Fischer, S., Weigel, W. and Medlin, L. K. (2017) Microarray (phylochip) analysis of freshwater pathogens at several sites along the Northern German coast transecting both estuarine and freshwaters. *Appl Microbiol Biot* **101**, 871–886.
- Binsztein, N., Costagliola, M. C., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramirez, F. C., Akselman, R., Vacchino, M., Huq, A. and Colwell, R. (2004) Viable but Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment of Argentina. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7481–7486.
- Coutard, F., Pommepuy, M., Loaec, S. and Hervio-Heath, D. (2005) mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol* **98**, 951–961.
- COVIS, annual summaries on human *Vibrio* cases reported to CDC. <https://www.cdc.gov/vibrio/surveillance.html>.
- Da-Silva, E., Barthelmebs, L. and Baudart, J. (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.
- De Decker, S. and Saulnier, D. (2011) Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immun* **30**, 691–699.
- Eiler, A., Johansson, M. and Bertilsson, S. (2006) Environmental Influences on *Vibrio* Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl Environ Microbiol* **72**, 6004–6011.
- Fang, G., Hammar, S., and Grumet, R. (1992) A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Bio Techniques* **13**, 52–54.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B. and Rediers, H. (2011) *Vibrio*

- anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention: Pathogen profile of *Vibrio anguillarum*. *J Fish Dis* **34**, 643–661.
- Garrido-Maestu, A., Chapela, M.-J., Peñaranda, E., Vieites, J. M. and Cabado, A. G. (2014) In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). *Food Control* **37**, 371–379.
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. and Imhoff, J. (2010) Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **409**, 267–299.
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B. and Colwell, R. R. (2002) Bacteria of the -Subclass Proteobacteria Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5498–5507.
- Huq, A., Sack, R. B., Nizam, A., Longini, I. M., Nair, G. B., Ali, A., Morris, J. G., Khan, M. N. H., Siddique, A. K., Yunus, M., Albert, M.J., Sack, D.A. and Colwell, R.R. (2005) Critical Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Environment of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4645–4654.
- Marcheggiani, S., D’Ugo, E., Puccinelli, C., Giuseppetti, R., D’Angelo, A., Gualerzi, C., Spurio, R., Medlin, L., Guillebault, D., Weigel, W., Helmi, K., and Mancini L. (2015) Detection of Emerging and Re-Emerging Pathogens in Surface Waters Close to an Urban Area. *Int J Environ Res Public Health* **12**, 5505–5527.
- Maynaud, G., Pourcher, A.-M., Ziebal, C., Cuny, A., Druilhe, C., Steyer, J.-P. and Wéry, N. (2016) Persistence and Potential Viable but Non-culturable State of Pathogenic Bacteria during Storage of Digestates from Agricultural Biogas Plants. *Front Microbiol* **7**, 1469.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4321–4326.
- Narracci, M., Acquaviva, M. I. and Cavallo, R. A. (2014) Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. *Environ Sci Pollut Res* **21**, 2378–2385.
- Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Blackstone, G. M., Murray, S. L. and DePaola, A. (2007) Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay with an Internal Amplification Control for the Detection of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5840–5847.
- Oberbeckmann, S., Fuchs, B. M., Meiners, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H. and Gerdt, G.

- (2012) Seasonal Dynamics and Modeling of a *Vibrio* Community in Coastal Waters of the North Sea. *Microb Ecol* **63**, 543–551.
- Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O. and Cohen, D. (2007) Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. *Environ Res* **103**, 390–396.
- Pollock, F. J., Morris, P. J., Willis, B. L. and Bourne, D. G. (2010) Detection and Quantification of the Coral Pathogen *Vibrio coralliilyticus* by Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5282–5286.
- Porebski, S., Bailey, L. G. and Baum, B. R. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Bio. Report* **15**, 8–15.
- Roller, B. R. K., Stoddard, S. F. and Schmidt, T. M. (2016) Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies. *Nat Rev Microbiol* **1**, 16160.
- Saulnier, D., De Decker, S. and Haffner, P. (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods* **77**, 191–197.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. (2012) PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* **113**, 1014–1026.
- Siboni, N., Balaraju, V., Carney, R., Labbate, M. and Seymour, J. R. (2016) Spatiotemporal Dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney Harbour Estuary. *Front Microbiol* **7**, 460.
- Tall, A., Teillon, A., Boisset, C., Delesmont, R., Tournon-Bodilis, A. and Hervio-Heath, D. (2012) Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. strains. *J Appl Microbiol* **113**, 361–372.
- Tarr, C. L., Patel, J. S., Pühr, N. D., Sowers, E. G., Bopp, C. A. and Strockbine, N. A. (2007) Identification of *Vibrio* Isolates by a Multiplex PCR Assay and rpoB Sequence Determination. *J Clin Microbiol* **45**, 134–140.
- Thompson, J. R., Randa, M. A., Marcelino, L. A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. and Polz, M. F. (2004) Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4103–4110.
- Turner, J. W., Good, B., Cole, D. and Lipp, E. K. (2009) Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME J* **3**, 1082–1092.
- Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D. G., Cerrano, C. and the VibrioSea

- Consortium. (2010) *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **12**, 2007–2019.
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P. C., Colwell, R. R., Höfle, M. G. and Pruzzo, C. (2012) Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *ISME J* **6**, 21–30.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Stauder, M., Stagnaro, L., Venier, P. and Pruzzo, C. (2015) Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* **17**, 1065–1080.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., Brettar, I., Colwell, R. R. and Pruzzo, C. (2016) Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, E5062–E5071.
- Wong, H. C. and Wang, P. (2004) Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol* **96**, 359–366.
- Zettler, E. R., Mincer, T. J. and Amaral-Zettler, L. A. (2013) Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ Sci Technol* **47**, 7137–7146.

III. qPCR TaqMan pour la détection et la quantification des espèces de *Vibrio* appartenant au clade Splendidus

III.1. Partie expérimentale

L'optimisation et l'évaluation des performances analytiques de la qPCR clade Splendidus ont été réalisées en suivant une démarche identique à celle employée pour la qPCR *Vibrio* spp. Ainsi, seules les modifications du protocole expérimental seront présentées ici.

III.1.1. Amorces et sonde TaqMan utilisées

La détection des espèces appartenant au clade Splendidus a été réalisée en ciblant une région de 142 pb au sein du gène codant pour l'ARNr 16S. Les séquences des amorces et de la sonde précédemment décrites par IFREMER (2013) et utilisées dans cette étude sont présentées dans le **tableau II-1**. La sonde TaqMan est modifiée à l'extrémité 5' par un groupement fluorescent FAM utilisé comme reporter et à l'extrémité 3' avec le fluorophore TAMRA utilisé en tant que « quencher ».

Tableau II-1 : Séquences des amorces et de la sonde TaqMan utilisées pour la quantification des espèces appartenant au clade Splendidus par qPCR.

Amorce ou sonde	Séquence (5'-3')	Modification
Amorce sens	ATCATGGCTCAGATTGAACG	Aucune
Amorce antisens	CAATGGTTATCCCCACATC	Aucune
Sonde	CCCATTAACGCACCCGAAGGATTG	5' FAM et 3' TAMRA

III.1.2. Conditions d'amplification par qPCR

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume final de 10 µL contenant 1 µL de tampon 10X, 1 µL de MgCl₂ 50 mmol.L⁻¹, 0,05 µL de Taq Platinum, 0,4 µL de dNTPs Master mix 20 mmol.L⁻¹, 0,25 µL de chacune des amorces 16S spF2 et 16S spR2 à 10 µmol.L⁻¹, 0,2 µL de sonde TaqMan à 10 µmol.L⁻¹, 0,8 µL de ROX à 15 µmol.L⁻¹, 5,05 µL d'eau ultra pure et 1 µL d'ADN (4-10 ng.µL⁻¹). Le fluorophore ROX est utilisé en tant que référence passive afin de normaliser les valeurs et d'exclure les variations de fluorescence non inhérentes à la PCR. Pour les témoins négatifs, l'ADN a été remplacé par de l'eau ultra pure.

III.1.3. Evaluation des performances analytiques de la qPCR

III.1.3.1. Détermination de l'efficacité PCR, de la répétabilité et de la reproductibilité

Pour la préparation des standards, seule la température d'hybridation des amorces a été modifiée à 60°C pour le clade Splendidus. Afin de réaliser une courbe de calibration, des standards de concentrations comprises entre $8,6 \cdot 10^6$ UG. μL^{-1} et 86 UG. μL^{-1} ont été utilisés.

III.1.3.2. Détermination des limites de détection et de quantification

Comme pour la qPCR *Vibrio* spp., les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été déterminées en suivant les recommandations fournies par la norme AFNOR XP T 90-471 initialement proposée pour la quantification de *Legionella* spp. par qPCR dans des échantillons d'eau (AFNOR, 2006).

La LD a été estimée à partir de dix séries de dilutions indépendantes allant de 125 à 4 UG. μL^{-1} . Afin de déterminer la LQ, des solutions contenant 100, 50 ou 25 UG. μL^{-1} ont été mesurées 8 fois ($k=8$). Il est important de rappeler qu'afin de valider une valeur en tant que LQ, la fidélité et la justesse de la méthode doivent toutes deux être vérifiées en utilisant les formules suivantes :

- Pour la fidélité : $(2 \times t_{\text{Tab}} \times s) \leq 0.5 \log$ (**formule 1**) avec t_{Tab} : valeur de la table de Student (au risqué 5%, pour $k-1$ degrés de liberté) et s : écart type
- Pour la justesse : $t_{\text{Tab}} > t_{\text{Cal}}$ avec t_{Cal} : $t = (\log x - \bar{x}_i') / (s/\sqrt{k})$ (**formule 2**) où x : concentration en ADN génomique testée ; x_i' : logarithme de la concentration en ADN génomique ; \bar{x}_i' : moyenne des x_i' and k : nombre de répétitions de mesures.

III.1.3.3. Evaluation de la spécificité

La spécificité de la qPCR clade Splendidus a été évaluée à l'aide d'extraits d'ADN issus de 21 souches de *Vibrio* dont 9 appartenant au clade Splendidus et 4 souches de non *Vibrio* phylogénétiquement proches ou fréquemment isolées dans les mêmes environnements que les *Vibrio*. Pour chacune des souches, les essais ont été réalisés en duplicats à partir de 4-10 ng. μL^{-1} d'ADN.

III.1.4. Application de la qPCR à l'analyse d'échantillons environnementaux

Les échantillons environnementaux sont les mêmes que ceux testés en qPCR *Vibrio* spp.

III.2. Résultats et discussion

III.2.1. Evaluation des performances analytiques de la qPCR

III.2.1.1. Détermination de l'efficacité PCR, de la répétabilité et de la reproductibilité

Lors de chaque expérience, une courbe de calibration a été générée afin de s'assurer du bon déroulement de l'amplification et de pouvoir par la suite quantifier l'ADN cible. Les efficacités PCR, obtenues sur 8 expériences distinctes dans une gamme de quantification linéaire allant de $8,6 \cdot 10^6$ UG. μL^{-1} et 86 UG. μL^{-1} , varient entre 89,3 et 109,9%, correspondant à des pentes comprises entre -3,608 et -3,104 avec des coefficients de corrélation R^2 associés aux droites de régression allant de 0,992 à 0,999. Un exemple de courbe de calibration obtenue est donné **Figure II-2**.

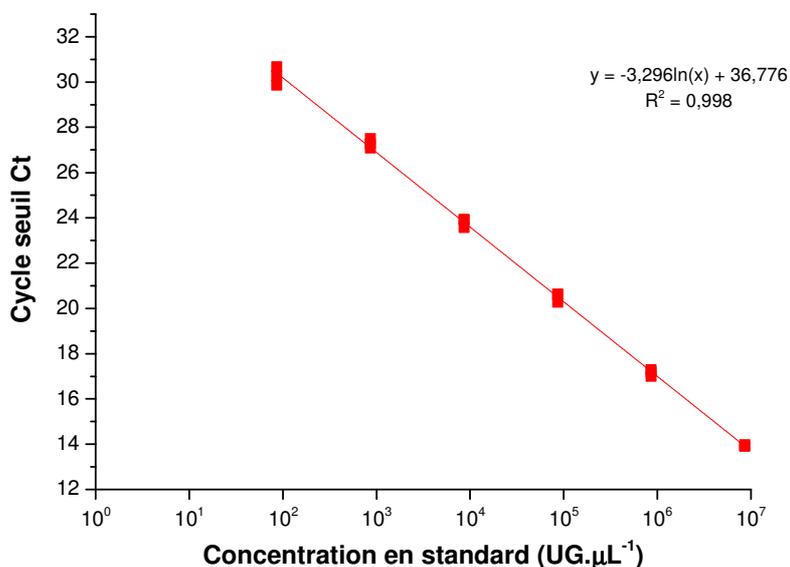


Figure II-2 : Exemple de courbe de calibration obtenue pour des concentrations en standard comprises entre $8,6 \cdot 10^6$ UG. μL^{-1} et 86 UG. μL^{-1} . Les valeurs mesurées pour les triplicats de chacune des concentrations en standard sont présentées.

La qPCR clade *Splendidus* présentée montre d'excellentes répétabilité et reproductibilité. En effet, en considérant les résultats obtenus pour 8 expériences distinctes, les coefficients de variation (CV) intra-essai et inter-essai sont respectivement compris entre 0,1-3,5 % et 5,4-8,8 %.

Afin de déterminer la LD, dix séries de dilutions indépendantes allant de 125 à 4 UG. μL^{-1} ont été analysées. Pour les solutions contenant 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, et 5 UG. μL^{-1} , les 10 échantillons testés apparaissent tous positifs (**Figure II-3**). Puis, à partir de 4 UG. μL^{-1} , seuls 9 échantillons sur les 10 testés permettent d'obtenir un signal en qPCR. Ainsi, la limite de détection correspondant au plus petit nombre d'unités génome pour lequel une amplification est observée au seuil de confiance 90%, est ici fixée à 4 UG. μL^{-1} .

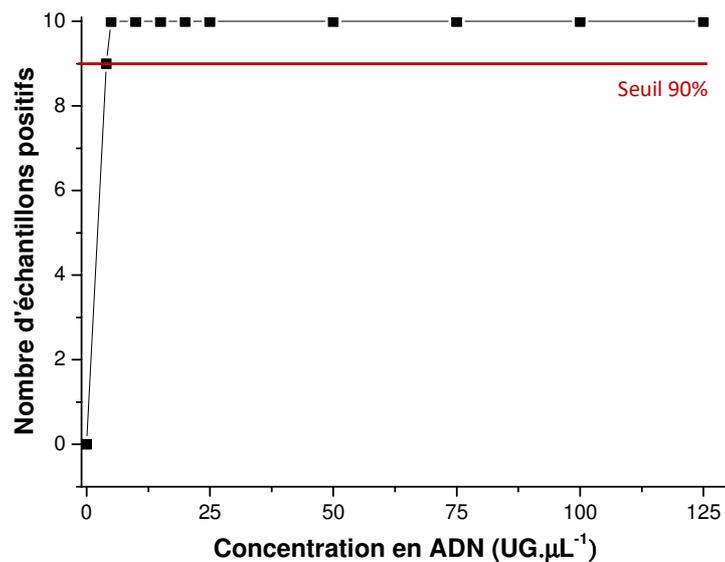


Figure II-3 : Détermination de la limite de détection correspondant à la plus faible concentration en ADN génomique pour laquelle au moins 90% des échantillons sont positifs.

Afin d'évaluer la LQ, une courbe de calibration a été générée à partir des standards de concentrations comprises entre $8,6 \cdot 10^6$ UG. μL^{-1} et 86 UG. μL^{-1} (**Figure II-4**). Cette courbe permet ensuite, à partir des Ct mesurés pour chacune des solutions testées, de déduire la valeur du logarithme de la concentration en ADN correspond. Les valeurs ainsi obtenues pour des solutions contenant 100, 50 et 25 UG. μL^{-1} sont présentées dans le **tableau II-2**.

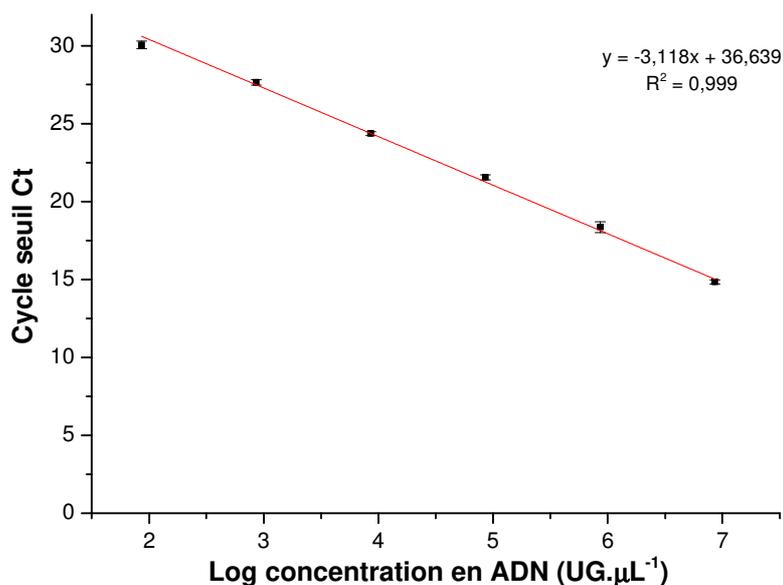


Figure II-4 : Détermination de la limite de quantification. Courbe de calibration obtenue pour des concentrations en standard comprises entre $8,6 \cdot 10^6$ UG.µL⁻¹ et 86 UG.µL⁻¹.

Tableau II-2 : Détermination de la limite de quantification à partir de solutions contenant 25, 50 et 100 UG.µL⁻¹ analysées 8 fois.

Réplicats	25 UG.µL ⁻¹		50 UG.µL ⁻¹		100 UG.µL ⁻¹	
	Ct mesuré	Log concentration ADN (UG.µL ⁻¹)	Ct mesuré	Log concentration ADN (UG.µL ⁻¹)	Ct mesuré	Log concentration ADN (UG.µL ⁻¹)
1	36,91	1,32	37,07	1,27	34,68	1,96
2	37,07	1,27	36,15	1,54	34,29	2,07
3	37,20	1,23	36,91	1,32	34,65	1,97
4	37,71	1,09	36,20	1,52	34,44	2,03
5	36,65	1,39	35,74	1,65	34,72	1,95
6	35,63	1,69	35,51	1,72	34,17	2,10
7	36,63	1,40	36,03	1,57	34,37	2,05
8	35,71	1,66	36,39	1,47	34,61	1,98
Moyenne	36,69	1,38	36,25	1,51	34,49	2,01
Ecart type	0,72	0,21	0,53	0,15	0,20	0,06

Selon la table de Student, au risque 5%, pour k-1 degrés de libertés, $t_{Tab} = 2,365$. Pour une concentration en ADN génomique de $25 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, le logarithme moyen de la concentration en ADN est de $1,38 \pm 0,21 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Ainsi, la formule $1, 2 \times t_{Tab} \times s \leq 0,5 \log$ n'est pas vérifiée puisque $2 \times 2,365 \times 0,21 = 0,99$. Par conséquent, la concentration de $25 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ne peut pas être retenue comme LQ. De la même manière, pour une concentration de $50 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, avec un logarithme moyen de $1,51 \pm 0,15 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, la formule 1 n'est pas vérifiée. Enfin, pour $100 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, avec une moyenne du logarithme de la concentration en ADN de $2,01 \pm 0,058 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, la formule 1 est vérifiée et par conséquent, la valeur de $100 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ peut être retenue comme LQ. Suivant la formule 2, $t_{Cal} = 0,585$ d'où $t_{Cal} < t_{Tab}$ et une valeur de $100 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ validée comme LQ.

III.2.1.2. Evaluation de la spécificité

L'ensemble des souches de *Vibrio* appartenant au clade Splendidus sont détectées par qPCR, avec des Ct inférieurs à 30. Des valeurs extrêmes de 14,64 et 26,89 ont respectivement été obtenues pour *V. gigantis* et *V. fortis* (**Tableau II-3**). Aucun signal n'est mesuré pour les souches de *Vibrio* ne faisant pas partie du clade Splendidus. De la même manière, aucune amplification n'est observée pour les souches de non *Vibrio* testées. Les résultats indiquent donc que la qPCR clade Splendidus est hautement spécifique puisqu'elle permet d'établir une discrimination entre les espèces de *Vibrio* appartenant à ce clade et celles n'en faisant pas partie ou appartenant à d'autres genres bactériens.

Tableau II-3 : Liste des souches bactériennes utilisées afin d'évaluer la spécificité de la qPCR clade Splendidus.

Souche	Référence	Résultat qPCR	Ct moyen
Inclusivité			
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108327	+	15,34
<i>V. crassostreae</i>	CIP 108329	+	18,84
<i>V. fortis</i>	CIP 108196	+	26,89
<i>V. gigantis</i>	CIP 108656	+	14,64
<i>V. lentus</i>	CIP 107166	+	16,94
<i>V. pomeroyi</i>	CIP 108273	+	16,91
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125	+	19,01
<i>V. tasmaniensis</i>	CIP 108272	+	15,79
<i>V. tasmaniensis</i> (LGP32)	CIP 107715	+	24,08
Exclusivité			
<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	ATCC 35048	-	> 44
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	-	> 44
<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	-	> 44
<i>V. cincinnatiensis</i>	CIP 104173	-	> 44
<i>V. coralliilyticus</i>	CIP 107925	-	> 44
<i>V. haliotocoli</i>	CIP 106283	-	> 44
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126	-	> 44
<i>V. mediterranei</i>	ATCC 43341	-	> 44
<i>V. natriegens</i>	ATCC 14048	-	> 44
<i>V. neptunius</i>	CIP 108274	-	> 44
<i>Aeromonas media</i>	BBCC-LMA3	-	> 44
<i>Colwellia polaris</i>	BBCC 768	-	> 44
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	BBCC 990	-	> 44
<i>Photobacterium lutimaris</i>	BBCC 2019	-	> 44

- résultat qPCR négatif ; + résultat qPCR positif.

III.2.2. Application de la qPCR à l'analyse d'échantillons environnementaux

La qPCR clade Splendidus a ensuite été appliquée à l'analyse des échantillons d'eau et de plancton préalablement testés en qPCR *Vibrio* spp. Cependant, aucun signal au dessus du seuil fixé n'a été mesuré pour l'ensemble des échantillons analysés. Afin d'expliquer ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Tout d'abord, l'absence de signal pourrait être causée par la présence d'inhibiteurs de PCR au sein des échantillons. Néanmoins, cette hypothèse apparaît peu probable puisque ce phénomène n'a pas été constaté pour les mêmes échantillons lors des essais effectués en qPCR *Vibrio* spp. L'ajout d'un étalon interne aux extraits avant analyse, permettrait de confirmer qu'aucune inhibition de la réaction d'amplification n'est observée. D'autre part, la concentration des espèces appartenant au clade Splendidus pourrait être inférieure à la limite de détection de la méthode de qPCR.

Toutefois, la limite de détection est de $4 \text{ UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, soit 200 UG pour un extrait de 50 μL . En se basant sur un nombre moyen d'opérons ribosomiques par cellule de *Vibrio* de 10,05, cela correspond à environ 20 *Vibrio* pour 50 μL d'extrait obtenu à partir de 50 mL de concentrât d'eau. Les dénombrements sur TCBS réalisés à partir des concentrats révèlent la présence de $1,37 \cdot 10^3$ à $1,86 \cdot 10^3 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ en juin et $4,48 \cdot 10^2$ à $7,4 \cdot 10^2 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ en juillet. Suite au séquençage des souches isolées au cours de ces deux mois, les *Vibrio* appartenant au clade Splendidus représentent 20% des *Vibrio* cultivables en juin et 35% en juillet. Ainsi, la limite de détection de la qPCR n'apparaît pas comme un argument recevable. Enfin, la spécificité du protocole ayant été testée sur des souches de référence, il se pourrait que la sonde TaqMan ne s'hybride pas correctement sur les séquences de souches isolées de l'environnement. Afin de vérifier cette hypothèse, l'ADN des souches cryoconservées suite aux échantillonnages devra être extrait puis analysé en qPCR.

IV. Conclusions du chapitre

Ce chapitre décrit l'adaptation et l'optimisation de deux protocoles de qPCR TaqMan basés sur la détection du gène codant pour l'ARNr 16S, l'un ciblant le genre *Vibrio* dans son ensemble, l'autre ciblant plus spécifiquement les espèces de *Vibrio* appartenant au clade Splendidus.

Concernant la qPCR *Vibrio* spp., puisqu'aucune sonde TaqMan n'avait préalablement été décrite dans la littérature, une sonde a dans un premier temps été conçue spécialement pour cette étude puis les conditions expérimentales ont été optimisées en se basant sur le protocole de qPCR SybrGreen proposé par Tall *et al.* (2012). L'évaluation des performances analytiques a ensuite révélé d'excellentes répétabilité et reproductibilité du protocole optimisé avec des coefficients de variation intra-essais et inter-essais inférieurs à 5%. De plus, des LD et LQ de 10 et 25 $\text{UG} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ont respectivement été obtenues. Dans la littérature, seuls deux articles présentent l'utilisation d'une qPCR ciblant *Vibrio* spp. (Thompson *et al.*, 2004 ; Tall *et al.*, 2012) et aucune précision n'est apportée concernant les LD et LQ. Ainsi, il nous est impossible de directement comparer les performances de notre protocole avec ceux d'autres protocoles déjà publiés. A notre connaissance, le protocole que nous proposons constitue la seule qPCR *Vibrio* pour laquelle les LD et LQ ont été déterminées en suivant les strictes recommandations d'une norme AFNOR (AFNOR XP T 90-471), renforçant ainsi la robustesse

du protocole proposé. Dans un second temps, la spécificité du protocole a été validée en démontrant 100% d'inclusivité et d'exclusivité pour les 43 souches bactériennes testées. Enfin, le test a été appliqué avec succès à l'analyse d'échantillons d'eau et de plancton récoltés dans la lagune de Salses-Leucate. En conclusion, la qPCR *Vibrio* spp. décrite dans cette étude apparaît comme une méthode sensible, spécifique, répétable et reproductible pour la détection et la quantification du genre *Vibrio*. De plus, nous avons constaté que les concentrations estimées par PCR apparaissent systématiquement plus élevées pour les échantillons de plancton que ceux d'eau. Afin de confirmer ces résultats, des expériences complémentaires sont d'ores et déjà prévues sur d'autres échantillons récoltés dans la lagune de Salses-Leucate. Les résultats seront ensuite inclus dans l'article avant soumission afin de répondre à une problématique écologique à savoir les réservoirs planctoniques des *Vibrio*.

Concernant l'optimisation de la qPCR clade Splendidus, une démarche similaire à celle présentée pour la qPCR *Vibrio* spp. a été suivie. Les amorces et la sonde TaqMan précédemment décrites par IFREMER (2013) ont été conservées puis le protocole a été optimisé en se basant sur celui proposé par cette équipe. Tout comme pour la qPCR *Vibrio* spp., le protocole s'avère répétable et reproductible avec des coefficients de variation intra-essais et inter-essais inférieurs à 10%. Des LD et LQ de 4 et 100 UG.μL⁻¹, ont respectivement été déterminées, toujours en suivant les recommandations fournies par la norme AFNOR XP T 90-471. La qPCR clade Splendidus présente 100% d'inclusivité et d'exclusivité pour les 23 souches bactériennes testées. Enfin, le protocole a été évalué sur les mêmes échantillons d'eau et de plancton que ceux analysés en qPCR *Vibrio* spp. Cependant, aucun signal n'a été mesuré pour l'ensemble des échantillons, nous laissant envisager deux hypothèses. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de vérifier qu'aucune inhibition de PCR n'est observée et que la sonde TaqMan s'hybride correctement sur les séquences des souches environnementales.

Chapitre III :
Développement de génocapteurs
pour la détection des *Vibrio*

I. Introduction

Afin de maîtriser le développement d'un biocapteur, diverses étapes sont nécessaires. La première consiste à choisir l'élément de reconnaissance biologique. Les *Vibrio* ne présentant pas d'antigène de surface commun à toutes les espèces ou à un groupe d'espèces donné, une détection des acides nucléiques a été envisagée grâce à l'utilisation de sondes ADN. Les génocapteurs ainsi développés utilisent les propriétés d'hybridation entre les sondes ADN simples brins immobilisées et les acides nucléiques cibles (**Figure III-1**). Ce type de biorécepteur présente également un avantage non négligeable puisqu'avec une même séquence de sonde ADN, il est possible de cibler aussi bien la fraction totale des bactéries *via* la détection de l'ADN que la fraction active *via* la reconnaissance de l'ARN. Afin de pouvoir concevoir les sondes ADN, le gène cible et plus précisément la séquence cible chez l'espèce étudiée doit ensuite être déterminée.

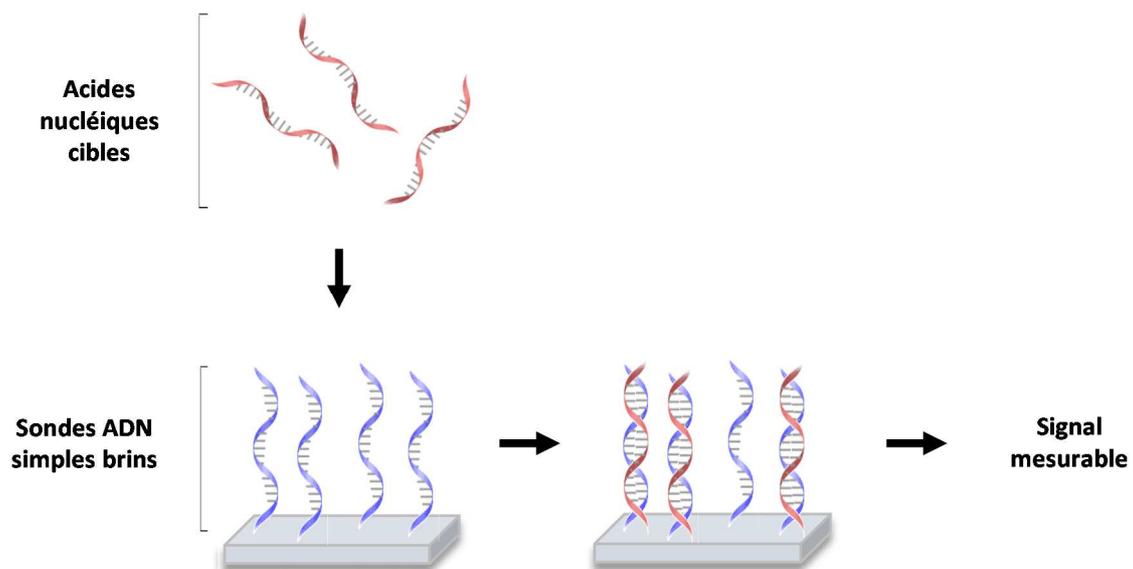


Figure III-1 : Principe général de fonctionnement d'un g nocapteur.

Dans un second temps, le format d'hybridation du g nocapteur est sélectionné. Trois types de formats différents sont envisageables. Le format dit « **sandwich** » repose sur le même principe que le test immunologique ELISA. Les acides nucléiques cibles s'intercalent entre une sonde capture immobilisée et une sonde signal marquée présentant toutes deux des séquences complémentaires à la cible afin de permettre l'hybridation. En raison de sa sensibilité et de sa spécificité liée à une double reconnaissance, il s'agit du format d'hybridation le plus courant (Li *et al.*, 2012 ; Paniel et Baudart, 2013 ; Abdalhai *et al.*, 2015).

Dans le cas du format **direct**, l'hybridation s'effectue entre les sondes immobilisées et les acides nucléiques cibles formant un complexe détecté directement, sans marquage (Tichoniuk *et al.*, 2010). Enfin, le format **compétitif** repose sur la compétition entre les acides nucléiques cibles et des brins d'ADN synthétiques marqués pour les sondes capture immobilisées (Liao *et al.*, 2009).

Une fois le format d'hybridation choisi, les sondes capture doivent être immobilisées à la surface du transducteur en sélectionnant une méthode d'immobilisation appropriée afin de maintenir l'intégrité des sondes sur cette surface tout au long de l'analyse.

La dernière étape consiste à choisir la méthode de transduction appliquée afin de détecter l'interaction entre la cible et les sondes immobilisées à la surface du transducteur.

Ce troisième chapitre décrit la mise au point des **génocapteurs** proposés dans cette étude. Deux formats d'hybridation différents, « **sandwich** » et **compétitif**, ont été sélectionnés. Les étapes du développement de ces outils sont présentées, comprenant la conception des sondes, la sélection des méthodes d'immobilisation du biorécepteur et des techniques de transduction, l'optimisation des protocoles expérimentaux et la validation des outils.

II. Partie expérimentale

II.1. Matériels

II.1.1. Réactifs et solvants

Les composés suivants ont été fournis par Sigma-Aldrich : l'acide hydrochlorique (HCl), l'acide sulfurique (H₂SO₄), le nitrite de sodium (NaNO₂), l'acide 4-amino benzo ique, l'éthanolamine, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), le N-hydroxysuccinimide (NHS), l'hydroquinone, le 1-Naphtyl phosphate, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le 3,3',5,5'-t tram thylbenzidine (TMB). Le réactif Luminata forte™ ELISA HRP Substrate a été acheté chez Merck Millipore.

Les anticorps anti-digoxygénine (DIG) couplés à la peroxydase de raifort (HRP) ou à la phosphatase alcaline (PAL) proviennent de chez Roche. La caséine Hammerstein a été fournie par MP Biomedicals et la neutravidine par Thermo Scientific.

Les sondes capture et signal ainsi que les cibles synthétiques utilisées en tant que contrôle positif (PC) ont été produites par la société Microsynth.

II.1.2. Composition des tampons

L'ensemble des tampons a été réalisé dans de l'eau distillée préalablement traitée au DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) afin d'inactiver les RNases. Les produits chimiques ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Diéthanolamine (DEA)

DEA 100 mmol.L⁻¹ ; MgCl₂ 5 mmol.L⁻¹ ; pH = 9,5

HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)

HEPES 100 mmol.L⁻¹ ; pH = 7,2

Hybridation 4X (HYB 4X)

NaCl 300 mmol.L⁻¹ ; Tris 80 mmol.L⁻¹ ; SDS 0,04% ; pH = 8,0

MES (Acide 2-(4-morpholinyl)  thane sulfonique)

MES 100 mmol.L⁻¹ ; pH = 5,5

Phosphate Buffer Saline 1X (PBS)

NaCl 137 mmol.L⁻¹ ; KCl 2,7 mmol.L⁻¹ ; Na₂HPO₄ 10 mmol.L⁻¹ ; KH₂PO₄ 1,76 mmol.L⁻¹ ; pH = 7,4

PBS-Tween-Albumine de sérum bovin (PBS-T-BSA)

PBS 1X ; BSA 0,1% ; Tween 20 0.05% ; pH = 7,4

POP 10X

NaH₂PO₄ 50 mmol.L⁻¹ ; NaCl 100 mmol.L⁻¹ ; pH = 6,45

Tampon de blocage (BB)

PBS 1X ; MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹ ; Tween 20 0,01% ; pH = 7,4

Tampon de fixation (Bead buffer)

Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ ; NaCl 300 mmol.L⁻¹ ; pH = 7,6

Tampon de fragmentation des ARN

ZnCl₂ 100 mmol.L⁻¹ ; Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ ; pH = 7

Tampon de mesure électrochimique en présence de bleu de méthylène

Na₂HPO₄ 100 mmol.L⁻¹ ; KH₂PO₄ 100 mmol.L⁻¹ ; KCl 100 mmol.L⁻¹ ; MgCl₂ 5 mmol.L⁻¹ ; pH = 7

II.1.3. Supports et appareillages

Les microplaques 96 puits ELISA, MaxiSorpTM transparentes, blanches et noires proviennent de chez Nunc. Les électrodes en carbone s rigrapi es ont été produites au sein du laboratoire BAE-LBBM à l'aide de l'appareil de s rigrapi e DEK 248 de chez Dek International.

Les mesures d'absorbance ont été réalisées avec le lecteur de microplaques Multiskan AscentTM de Thermo Scientific et celles de fluorescence et de chimiluminescence à l'aide du lecteur de microplaques Fluoro-Luminoskan AscentTM FL de chez Thermo Scientific. L'agitateur thermostaté Thermomixer[®] Comfort pour microplaques et tubes a été fourni par Eppendorf. L'ensemble des mesures de voltammétrie cyclique a été réalisée à l'aide de la station

 lectrochimique Autolab PGSTAT100 contrôlée par le logiciel General Purpose Electrochemical System (Metrohm Autolab B.V.). Les mesures de voltamm tries cyclique et à balayage linéaire ont été effectuées avec le potentiostat/galvanostat multivoies μ Stat 8000 de DropSens.

II.2. Formats d'hybridation

II.2.1. Principe du format d'hybridation « sandwich »

Dans le cas du format d'hybridation « sandwich », les acides nucléiques cibles, ici l'ARNr 16S s'hybrident entre les sondes capture immobilisées à la surface du support grâce à l'affinité neutravidine/biotine et les sondes signal modifiées par une protéine, la digoxygénine. Cette reconnaissance biologique est ensuite révélée grâce à un système enzymatique conduisant à un signal proportionnel à la quantité de cible capturée. Il s'agit donc d'un système « ON » où la réponse est proportionnelle à la concentration en cible dans le milieu réactionnel (**Figure III-2**).

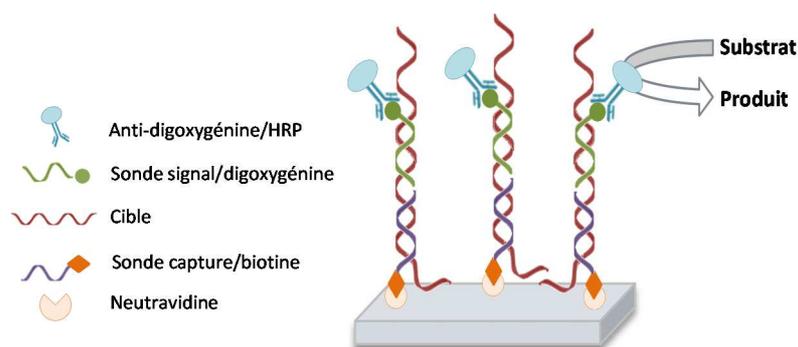


Figure III-2 : Principe du format d'hybridation « sandwich » développé dans cette thèse.

II.2.2. Principe du format d'hybridation compétitif

Le format d'hybridation compétitif est dérivé du principe utilisé pour le développement d'un système d'immunodétection en flux nommé AWACSS (Automated Water Analyser Computer Supported System) (Tschmelak *et al.*, 2005). Ce système permettant la détection de plusieurs micropolluants tels que l'atrazine, le bisphénol A et les sulphonamides dans l'eau, est basé sur la compétition entre les cibles présentes dans l'échantillon et des cibles synthétiques immobilisées à la surface du support pour des anticorps marqués par un fluorophore (**Figure III-3**).

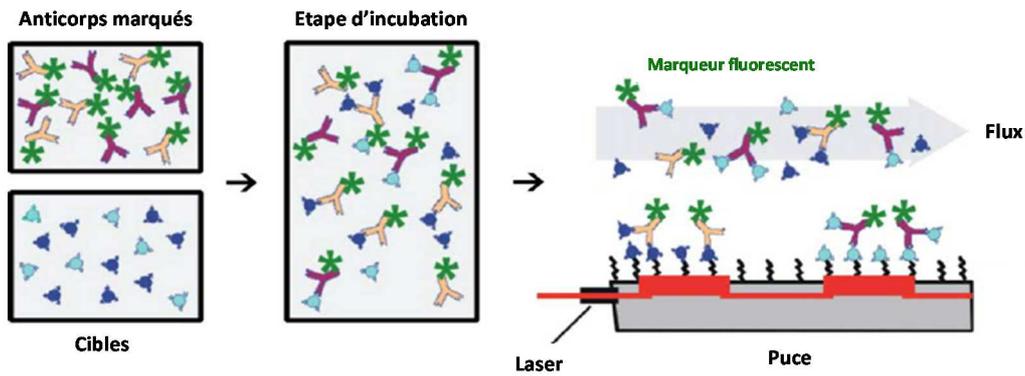


Figure III-3 : Principe de fonctionnement du système d'immunodétection en flux AWACSS (Tschmelak *et al.*, 2005).

Dans notre étude, les anticorps sont remplacés par des sondes signal et capture présentant des séquences complémentaires l'une de l'autre (Figure III-4). La sonde signal est dans un premier temps mise en contact avec l'échantillon à analyser. En l'absence de cible, cette sonde s'hybride avec la sonde capture préalablement immobilisée à la surface du support, conduisant à la génération d'un signal maximal. A l'inverse, en présence de la cible, la sonde signal est « piégée » par la cible, empêchant ainsi l'hybridation sonde signal/sonde capture. Lors des lavages, le complexe sonde signal/cible est éliminé. Ainsi, il s'agit ici d'un « système OFF » puisque plus la concentration en cible dans l'échantillon est élevée, plus la réponse générée est faible.

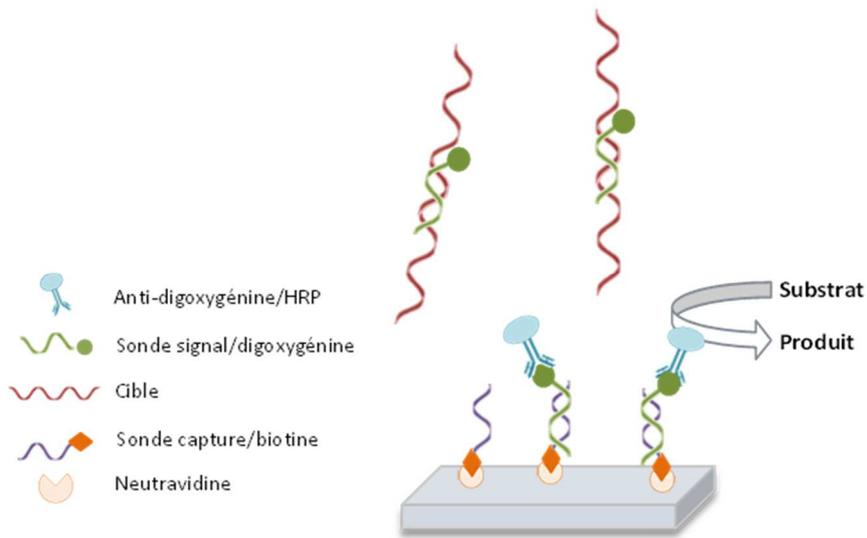


Figure III-4 : Principe du format d'hybridation compétitif développé dans cette thèse, ici dans le cas d'une détection colorimétrique.

II.3. Design des sondes

Dans cette étude, nous avons choisi de cibler le gène codant pour l'ARNr 16S en raison de son utilisation comme marqueur taxonomique, et de fait, du nombre important de séquences présentes dans les bases de données. De plus, puisque nous souhaitons développer un outil ne nécessitant aucune amplification PCR préalable de la cible, le choix de ce gène, présentant en moyenne 10,05 opérons ribosomiques dans le génome des *Vibrio* (Roller *et al.*, 2016) s'avère judicieux afin de multiplier les chances de détection.

II.3.1. Format d'hybridation « sandwich »

L'utilisation d'un format d'hybridation « sandwich » nécessite la conception de deux sondes, capture et signal. La première étape consiste à construire une base de données personnelle contenant les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de *Vibrio* et non *Vibrio*. Pour cela, les séquences de souches types sont extraites de la base de données RDP (Ribosomal Database Project, <https://rdp.cme.msu.edu/>). Après nettoyage et alignement des séquences, un graphique représentant l'entropie en fonction de la position sur le gène 16S est généré à partir des séquences présentes dans notre base de données. Cela permet de visualiser les zones de faible et forte entropie correspondant respectivement à des régions du gène 16S très conservées et très variables au sein du genre *Vibrio*. Un second graphique d'entropie est ensuite généré en ajoutant également les séquences des souches de non *Vibrio*. La comparaison entre les deux graphiques permet de définir plusieurs zones de travail, correspondant à des zones très conservées au sein du genre *Vibrio* mais non partagées avec les non *Vibrio*. Chaque zone est ensuite étudiée une par une afin de trouver une séquence de 70 pb, correspondant à une sonde capture de 35 pb et une sonde signal de 35 pb adjacente. Dans un cadre de lecture 5'-3', la sonde signal doit être placée avant la sonde capture. Plusieurs couples de sondes sont ainsi sélectionnés. Il est dans un premier temps nécessaire de vérifier que les deux sondes ne peuvent pas s'hybrider entre elles puis, d'estimer pour chacune des sondes, le pourcentage en GC, la capacité d'auto-hybridation et de formation de structure en épingle à cheveu à l'aide du logiciel OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Cela permet de conserver le meilleur couple de sondes dont la spécificité est à nouveau vérifiée *in silico* par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contre les bases de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) et Silva (<http://www.arb->

silva.de/). Un oligonucléotide de 70 pb correspondant à la séquence complémentaire des deux sondes capture et signal est utilisé comme standard (PC, positive control) pour la calibration du système. Les séquences des sondes et des PC ainsi obtenues sont présentées dans le **tableau III-1**.

Tableau III-1 : Séquences des sondes et PC utilisés en format d'hybridation « sandwich ».

Fonction	Séquence (5'-3')	Modification
Sonde capture	TTGAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAATGAAC	Biotine (5')
Sonde signal	ACCTGCATGCGCTTACGCCAGTAATCCGATTA	Digoxigénine (3')
PC	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTG TTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAA	Aucune

La sonde capture est modifiée à son extrémité 5' avec une biotine afin de permettre son immobilisation à la surface du support recouvert de neutravidine et la sonde signal est modifiée en 3' par une digoxigénine reconnue par un couple anticorps/enzyme conduisant à la génération du signal. Les sondes et le PC, synthétisés par la société Microsynth (Suisse), ont été reçus sous forme lyophilisée puis ensuite resuspendus dans de l'eau ultra-pure afin d'obtenir des solutions stock à 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

II.3.2. Format d'hybridation compétitif

A la différence du format « sandwich », une seule séquence, correspondant à la sonde signal doit être spécifique de la cible, simplifiant ainsi l'étape de conception des sondes. La sonde capture correspond ensuite au complément inverse de la sonde signal. Pour ce format d'hybridation, deux couples de sondes ont été conçus, un pour la détection du genre *Vibrio* dans son ensemble et un pour le clade Splendidus. Pour le genre *Vibrio*, la séquence de la sonde signal utilisée en format « sandwich » a été conservée, seule la séquence de la sonde capture a été modifiée afin de pouvoir s'hybrider avec la sonde signal. Pour le clade Splendidus, deux nouvelles sondes, ciblant également le gène codant pour l'ARNr 16S, ont été conçues en suivant les mêmes critères que ceux employés pour le format « sandwich ». Les séquences des sondes et des PC correspondant sont présentées dans le **tableau III-2**.

Tableau III-2 : Séquences des sondes et PC utilisés en format d'hybridation compétitif.

Cible	Fonction	Séquence (5'-3')	Modification (3')
<i>Vibrio spp.</i> 16S	Sonde capture	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT	Biotine ou NH ₂
	PC	TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT	Aucune
	Sonde signal	ACCTGCATGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTA	Digoxygénine ou MB
Clade <i>Splendidus</i> 16S	Sonde capture	CCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTAGAGT	Biotine
	PC	CCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTAGAGT	Aucune
	Sonde signal	ACTCTAGTTCACCAGTTTCAAATGCAGTCCGAGG	Digoxygénine ou FAM

En fonction de la méthode d'immobilisation de la sonde capture, celle-ci est modifiée en 3' soit avec une biotine, soit avec un groupement amine. De la même manière, suivant la méthode de transduction employée, la sonde signal est modifiée avec une digoxygénine, le bleu de méthylène (MB) ou la fluorescéine amidite (FAM).

II.4. Choix des supports

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux types de supports pour l'immobilisation des sondes capture, à savoir les microplaques 96 puits permettant d'analyser de nombreux échantillons en une seule fois ainsi que des électrodes en carbone sérigraphiées produites en masse au sein du laboratoire BAE-LBBM et présentant une très grande versatilité.

Les électrodes utilisées au cours de ce travail sont constituées de 3 parties différentes (**Figure III-5**) :

- l'électrode de travail en pâte de carbone, de diamètre de 4 mm, sur laquelle les sondes capture sont immobilisées.
- l'électrode de référence à base de pâte d'argent (*vs.* Ag/AgCl) de potentiel connu et utilisée pour mesurer le potentiel appliqué à l'électrode de travail.
- l'électrode auxiliaire en pâte de carbone permettant de mesurer le courant généré à l'électrode de travail.

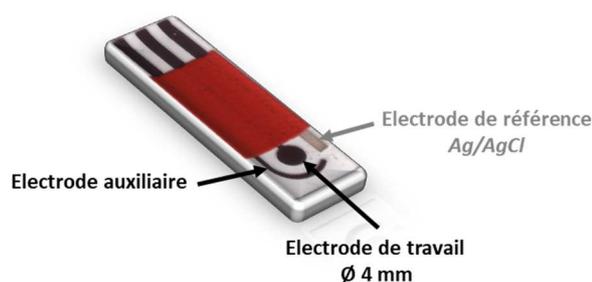


Figure III-5 : Schéma d'une électrode de carbone sérigraphiée produite au laboratoire.

Depuis les années 1990, la technologie du « screen-printing », ou sérigraphie, empruntée à la micro-électronique, a permis la production de masse d'électrodes à faible coût pour le développement de biocapteurs. Les électrodes sérigraphiées sont fabriquées en déposant sur un support inerte (plastique ou céramique) des encres conductrices au travers de masques poreux (Figure III-6). La grande versatilité de ce type d'électrodes constitue un avantage majeur puisqu'elles peuvent être fabriquées à façon et être adaptées à chaque analyse en incluant dans les encres d'impression différents composés tels que des médiateurs électrochimiques, des métaux ou encore des enzymes (Dominguez Renedo *et al.*, 2007). Elles peuvent également être modifiées ultérieurement en déposant sur leur surface diverses substances telles que des enzymes ou des polymères (Hart *et al.*, 2004).

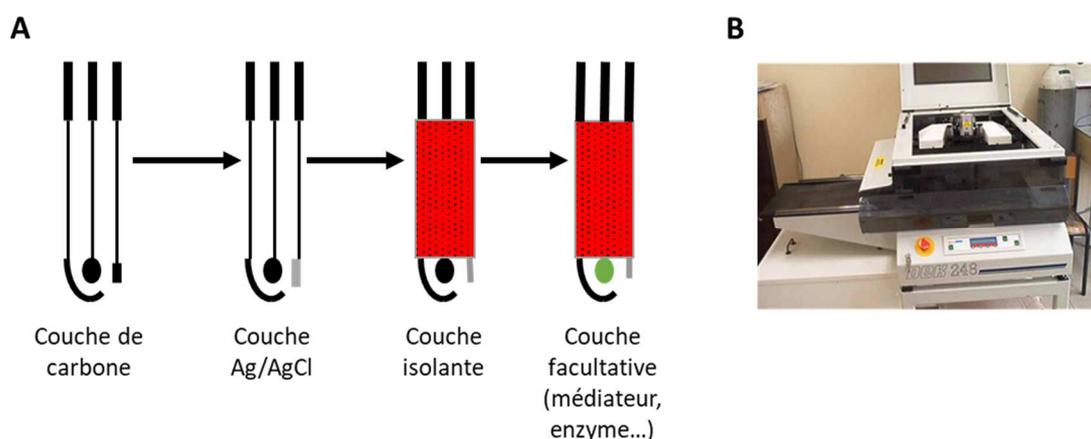


Figure III-6 : (A) Étapes de fabrication des électrodes sérigraphiées et (B) système de sérigraphie semi-automatique DEK 248 employé au laboratoire.

II.5. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs

Le choix de la méthode la plus appropriée pour l'immobilisation des biorécepteurs va dépendre de la nature du transducteur choisi. Aujourd'hui, les stratégies basées sur l'affinité biologique avidine/biotine et le couplage covalent sont couramment employées pour l'immobilisation des sondes ADN (Sassolas *et al.*, 2008). Dans notre cas, les biorécepteurs ont été modifiés en 3' soit avec une biotine afin de permettre leur immobilisation au fond des microplaques tapissées de neutravidine, soit avec un groupement amine pour le couplage covalent sur des électrodes à la surface desquelles des groupements carboxyles ont préalablement été générés (**Figure III-7**). Le couplage covalent par la méthode EDC-NHS est décrit en détails dans le paragraphe 3.2.3.

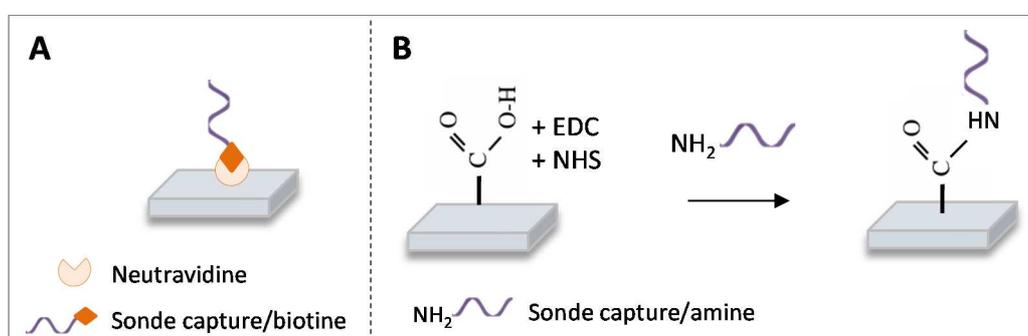


Figure III-7 : Stratégies d'immobilisation utilisées dans cette étude pour l'immobilisation des sondes ADN à la surface du support. **(A)** Affinité biotine/neutravidine ; **(B)** Couplage covalent sur surface fonctionnalisée.

II.6. Méthodes de transduction

II.6.1. Format d'hybridation « sandwich »

II.6.1.1. Détection en colorimétrie

Le protocole expérimental est adapté de celui précédemment décrit par Paniel et Baudart (2013). Cent microlitres de neutravidine diluée à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du tampon HEPES sont déposés au fond des puits d'une microplaque MaxiSorp™. Après 1h d'incubation à température ambiante, l'excès de neutravidine est éliminé par réalisation de 3 lavages successifs avec du tampon PBS 1X. La sonde capture, préalablement diluée à 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dans du tampon Bead buffer, est dénaturée grâce à un cycle de 3 min à 90°C, 2 min à 4°C et 5 min à température ambiante. Cent microlitres de sonde capture dénaturée sont ajoutés dans chacun des puits de la microplaque qui est ensuite incubée 30 min à température ambiante. Afin d'éliminer les sondes capture non fixées, 3 lavages successifs sont réalisés avec du

tampon d'hybridation 1X. Le blocage des sites non spécifiques est ensuite réalisé en ajoutant dans les puits 100 μL de caséine Hammerstein préalablement diluée à 1% dans du tampon de blocage. Après 45 min d'incubation à température ambiante, 3 lavages successifs à l'aide de tampon d'hybridation 1X permettent d'éliminer l'excès de caséine. Le mélange de pré-hybridation contenant 25 μL de tampon d'hybridation 4X, 10 μL de sonde signal à 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 10 μL de la cible et 55 μL d'eau ultra-pure est incubé 10 min à 65°C avant d'être ajouté dans les puits. Après 30 min d'incubation à 46°C, les puits sont rincés 3 fois avec du tampon POP 1X. La modification de la sonde signal à son extrémité 3' avec une protéine, la digoxygénine, permet la fixation d'un conjugué anticorps anti-DIG couplée à l'HRP. Ainsi, 100 μL de conjugué anticorps anti-DIG/HRP à 50 mU dans du tampon PBS-T-BSA sont ajoutés dans chacun des puits avant d'incuber la microplaque 20 min à température ambiante. L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages successifs avec du tampon POP 1X. La révélation est ensuite réalisée en ajoutant 100 μL de réactif prêt à l'emploi TMB (3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine). En présence de peroxyde d'hydrogène, ce substrat est oxydé par l'enzyme HRP, conduisant à la formation d'un précipité bleu (**Figure III-8**). Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 630 nm à l'aide du lecteur de microplaques Multiskan Ascent™.

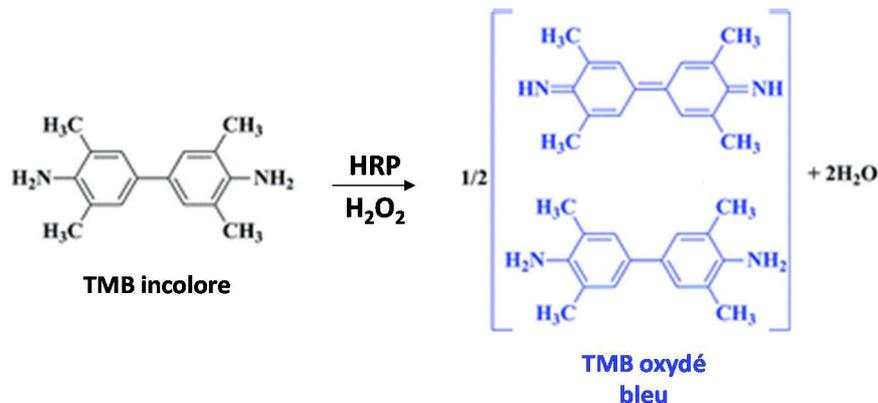


Figure III-8 : Réaction d'oxydation du TMB par l'HRP en présence de peroxyde d'hydrogène (d'après Chai *et al.*, 2015).

Les essais ont été réalisés en triplicats et comprenaient des témoins permettant de valider les résultats. Tout d'abord, des blancs pour lesquels la cible était remplacée par de l'eau ultra pure, nous ont permis d'obtenir les valeurs correspondant au bruit de fond de la méthode, ces valeurs étant ensuite retranchées aux résultats obtenus. Afin d'être considérés comme significatifs, les résultats devaient être au minimum 3 fois plus importants que le bruit de fond. Afin de s'assurer que la réponse ne provienne pas d'une interaction non spécifique entre les

différents réactifs utilisés au cours du test, les combinaisons suivantes ont également été testées :

- Neutravidine, anti-DIG/HRP, TMB
- Neutravidine, caséine, anti-DIG/HRP, TMB
- Neutravidine, caséine, sonde capture, anti-DIG/HRP, TMB
- Neutravidine, caséine, sonde signal, anti-DIG/HRP, TMB

Enfin, lors des essais avec des acides nucléiques extraits de suspensions bactériennes pures ou d'échantillons réels, deux concentrations en PC ont également été utilisées en tant que témoins positifs.

II.6.1.2. Détection en chimiluminescence

Dans le cas de la détection en chimiluminescence, seule l'étape de révélation diffère du protocole présenté ci-dessus. Le TMB est remplacé par le réactif Luminata forte™ ELISA HRP Substrate contenant du luminol et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxyde d'hydrogène, l'oxydation du luminol par l'HRP conduit à la formation du 3-aminophtalate dans un état excité, émettant des photons pour retourner à son état fondamental (**Figure III-9**). La luminescence ainsi émise est mesurée à l'aide du Fluoro-Luminoskan Ascent™ FL. Des microplaques 96 puits de couleur blanche sont utilisées afin d'améliorer les signaux de chimiluminescence mesurés.

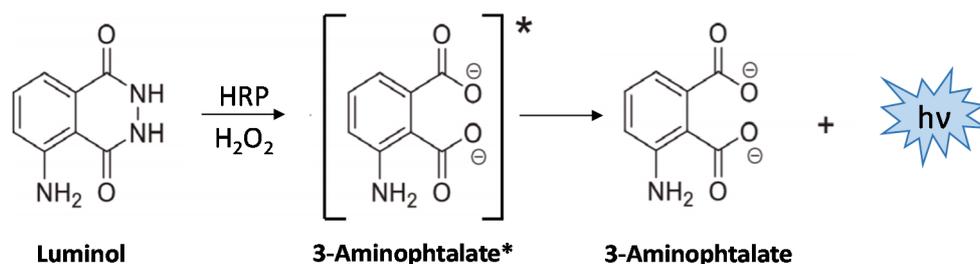


Figure III-9 : Réaction de chimiluminescence par oxydation du luminol (d'après Schutz Geschwender, 2013).

De la même façon que pour les essais en détection colorimétrique, des témoins ont été réalisés et les essais ont été effectués en triplicats.

II.6.2. Format d'hybridation compétitif

II.6.2.1. Détection en colorimétrie

Le protocole expérimental est basé sur celui utilisé pour le format d'hybridation « sandwich ». Cependant, le développement de ce nouveau format a nécessité l'optimisation de plusieurs paramètres tels que les concentrations en sonde signal et capture utilisées ainsi que les temps et les températures des étapes de pré-hybridation (sonde signal/cible) et d'hybridation (sonde capture/sonde signal). L'ensemble des essais a été réalisé en triplicats et comprenait les mêmes témoins que ceux utilisés en format « sandwich ».

II.6.2.2. Détection en fluorescence

Le protocole expérimental est identique à celui employé en détection colorimétrique. Cependant, la sonde signal étant directement marquée avec le fluorophore FAM, à la place de la digoxygénine, l'étape d'ajout du conjugué anticorps/enzyme est éliminée. La fluorescence émise est mesurée à des longueurs d'onde d'absorption et d'émission de 495 nm et 520 nm à l'aide du Fluoro-Luminoskan Ascent™ FL. Afin de minimiser les bruits de fond et la diffusion de la lumière, des microplaques de 96 puits de couleur noire sont utilisées. Chacun des tests a été effectué en triplicats.

II.6.2.3. Détection en électrochimie

II.6.2.3.1. Principe de détection

Dans cette étude, la méthode d'analyse électrochimique utilisée est la voltammétrie d'impulsion différentielle (DPV, Differential Pulse Voltammetry). La voltammétrie est une méthode électrochimique consistant à appliquer un potentiel donné entre l'électrode de travail et l'électrode de référence afin de conduire à l'oxydation ou la réduction des composés présents à la surface de l'électrode de travail. Dans le cas de la voltammétrie d'impulsion différentielle, une impulsion de potentiel d'amplitude E_{pulse} et de durée t_{pulse} est appliquée à intervalles réguliers. A chaque cycle, le potentiel est incrémenté (ΔE) d'où l'allure en escalier de la séquence de potentiels appliqués (**Figure III-10**). Le courant est mesuré avant (i_1) et à la fin de l'impulsion (i_2) puis la différence entre les deux courants obtenus permet de tracer une courbe représentant les variations d'intensité du courant en fonction du potentiel appliqué.

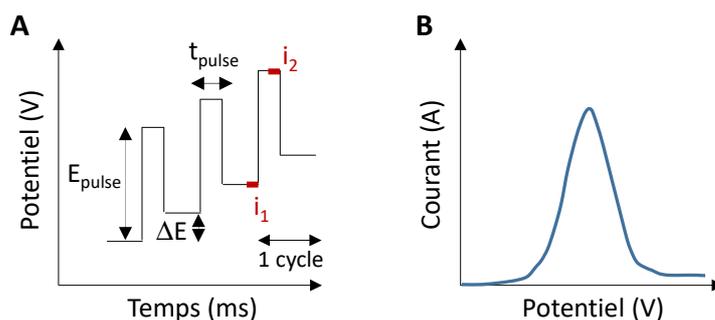


Figure III-10 : (A) Séquence de potentiel utilisée en DPV et (B) allure d'une courbe courant/potentiel obtenue.

Deux autres techniques de voltammétrie ont été employées afin de préparer les électrodes utilisées au cours de cette étude. Il s'agit de la voltammétrie cyclique basée sur une variation linéaire du potentiel jusqu'à une borne supérieure puis retour vers une borne inférieure afin de réaliser un cycle, et la voltammétrie à balayage linéaire utilisant également une variation linéaire du potentiel mais seulement jusqu'à un potentiel final, sans réaliser de cycle.

II.6.2.3.2. Marquage direct de la sonde signal au bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (MB) est un composé organique électroactif couramment employé comme sonde rédox pour le développement de biocapteurs à ADN. Le MB correspond à la forme oxydée du composé, la forme réduite est le bleu de leucométhylène (Figure III-11). Placé à proximité de la surface de l'électrode, le MB peut échanger des électrons avec celle-ci. Le potentiel de réduction de ce composé étant d'environ -275 mV vs. Ag/AgCl, nous nous attendons à observer, en absence de cible, un signal maximal à ce potentiel.

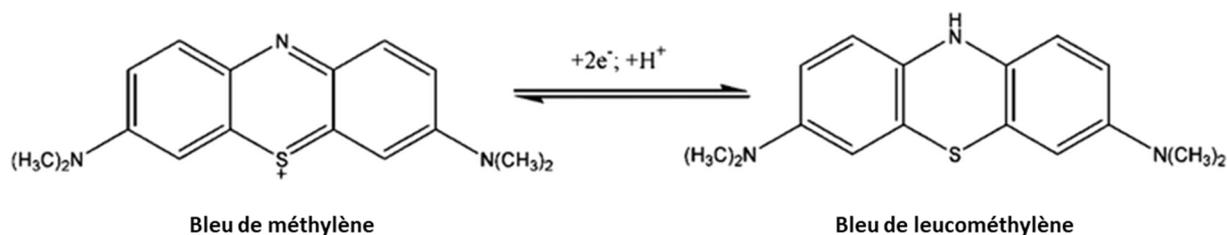


Figure III-11 : Réaction d'oxydo-réduction du bleu de méthylène (d'après Farjami *et al.*, 2010).

Les électrodes ont été préparées suivant un protocole adapté de Yugender Goud *et al.* (2016). Dans un premier temps, les électrodes de carbone ont été soumises à une étape de pré-traitement électrochimique en appliquant, en voltammétrie cyclique, 6 cycles successifs de 1 à -1,5 V vs. Ag/AgCl avec une vitesse de balayage de $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ dans une solution d' H_2SO_4

à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ contenant $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl. Après lavage des électrodes à l'eau distillée, le greffage covalent des sondes capture a été réalisé par réduction du diazonium en milieu acide. Pour cela, $8 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de NaNO_2 à 1 mol.L^{-1} ont été ajoutés à 4 mL d'acide 4-amino benzoïque à 2 mmol.L^{-1} préalablement préparé dans de l'acide chlorhydrique à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Après mélange, la solution ainsi obtenue a été incubée 10 min à température ambiante. La modification des électrodes par les sels de diazonium ainsi générés a été réalisée par réduction en voltammétrie à balayage linéaire de $0,6$ à $-0,8 \text{ V}$, avec une vitesse de balayage de 50 mV.s^{-1} . Après rinçage des électrodes, les groupements carboxyles à la surface des électrodes ont ensuite été activés par immersion dans une solution contenant 100 mmol.L^{-1} d'EDC et 25 mmol.L^{-1} de NHS préparée dans du tampon MES pH 5,5. Les électrodes ont été incubées pendant au moins 1 h à température ambiante sous atmosphère humide avant d'être à nouveau rincées à l'eau distillée. Puis, $20 \text{ }\mu\text{L}$ de sonde capture modifiée par un groupement amine à $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ sont ajoutés à la surface des électrodes qui sont ensuite incubées 1 nuit à 4°C . Après élimination des sondes capture non fixées par rinçage avec du tampon HYB 1X, de l'éthanolamine à 1 mol.L^{-1} a été ajouté afin de désactiver les groupements succinimide restants. Après 45 min d'incubation à température ambiante, les électrodes ont à nouveau été rincées à l'aide de tampon HYB 1X. Une étape de blocage à la caséine 1% à, dans certains cas, été rajoutée afin de bloquer l'ensemble des sites non spécifiques. Les étapes de pré-hybridation et d'hybridation ont ensuite été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites en colorimétrie. Seuls les volumes déposés sur le support changent puisqu'ici $20 \text{ }\mu\text{L}$ sont déposés au lieu de $100 \text{ }\mu\text{L}$ en colorimétrie. Les tampons de rinçage utilisés entre chaque étape restent les mêmes. Après l'étape d'hybridation de la sonde signal marquée au MB avec la sonde capture immobilisée, $100 \text{ }\mu\text{L}$ de tampon de mesure sont ajoutés sur les électrodes et le signal est mesuré en utilisant les paramètres de DPV suivants :

- Temps de modulation : $0,07 \text{ s}$
- Temps d'intervalle : $0,2 \text{ s}$
- Potentiel initial : 0 V
- Potentiel final : $-0,4 \text{ V}$
- Incrément du potentiel : $0,00195 \text{ V}$
- Amplitude du potentiel : $0,03 \text{ V}$

II.6.2.3.3. Marquage de la sonde signal avec un couple anticorps/enzyme

Deux types d'enzymes, l'HRP et la PAL, possédant des mécanismes d'action différents ont été utilisés. Lorsque la sonde signal est marquée avec un anticorps couplé à l'HRP, le signal résulte de l'addition d' H_2O_2 en présence d'hydroquinone utilisée en tant que médiateur rédox. Dans ce système, l'HRP catalyse la réduction de l' H_2O_2 couplée à l'oxydation de l'hydroquinone (HQ) en benzoquinone (BQ) (**Figure III-12**). La benzoquinone est ensuite électrochimiquement réduite en hydroquinone à la surface de l'électrode générant ainsi un courant aux alentours de - 200 mV vs. Ag/AgCl.

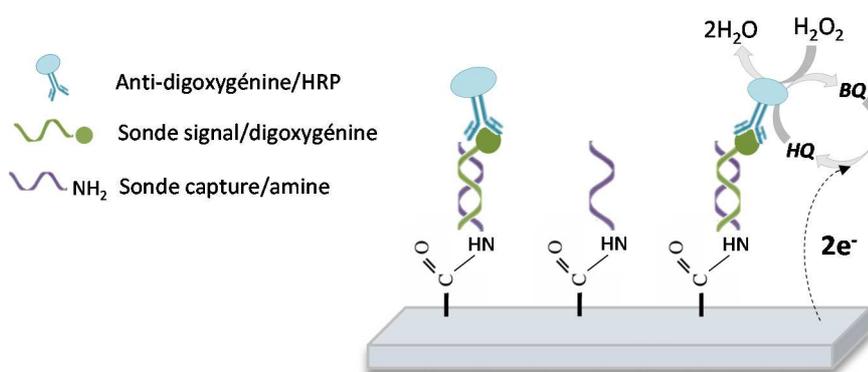


Figure III-12 : Principe de détection électrochimique utilisé en format compétitif en présence d'un marquage enzymatique avec l'HRP.

Lorsque la sonde signal est marquée à l'aide d'un anticorps couplé à la PAL, la génération du signal est basée sur la déphosphorylation du 1-naphtyl phosphate en substrat électroactif, le 1-naphtol, qui est ensuite oxydé à l'électrode en 1-iminoquinone (**Figure III-13**). Le signal d'oxydation ainsi généré est observé à +200 mV vs. Ag/AgCl en DPV.

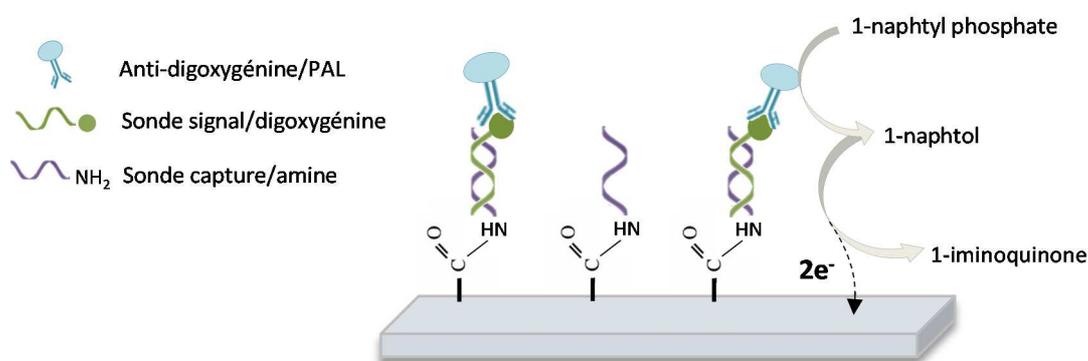


Figure III-13 : Principe de détection électrochimique utilisé en format compétitif en présence d'un marquage enzymatique avec la PAL.

Concernant le protocole expérimental, les étapes de préparation des électrodes, de fixation de la sonde capture, de pré-hybridation et d'hybridation de la sonde signal sont réalisées comme décrit paragraphe 2.3.2 pour le marquage au MB. La seule différence repose sur l'ajout d'un conjugué anticorps/HRP ou anticorps/PAL à 50 mU.mL^{-1} avant d'effectuer la mesure en DPV. Après 20 min d'incubation à température ambiante, les électrodes sont rincées afin d'éliminer l'excès de conjugué anticorps/enzyme. La mesure est réalisée après ajout d'une solution d' H_2O_2 (1 mmol.L^{-1})/hydroquinone (1 mmol.L^{-1}) avec l'HRP et de naphtyl phosphate 20 mmol.L^{-1} dans du tampon DEA $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ avec la PAL. Il apparaît important de noter que les lots d'électrodes ainsi que les substrats enzymatiques ont été préparés au fur et à mesure des expériences, pouvant ainsi induire pour des conditions expérimentales identiques, des variations au niveau de l'intensité du signal mesuré. Les paramètres DPV utilisés sont les suivants :

- Temps de modulation : 0,07 s
- Temps d'intervalle : 0,2 s
- Potentiel initial : 0,2 V avec l'HRP et 0 V avec la PAL
- Potentiel final : - 0,4 V avec l'HRP et 0,4 V avec la PAL
- Incrément du potentiel : 0,00195 V
- Amplitude du potentiel : 0,03 V

III. Résultats et discussion

III.1. Format d'hybridation « sandwich »

L'ensemble du travail inhérent au développement du système à format d'hybridation « sandwich » a fait l'objet d'une publication dans le journal « Environmental Science and Pollution Research » présentée ci-dessous et précédée d'un résumé des principaux résultats obtenus.

- **ARTICLE 3. DEVELOPMENT OF A PCR-FREE DNA-BASED ASSAY FOR THE SPECIFIC DETECTION OF *VIBRIO* SPECIES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES BY TARGETING THE 16S *rRNA*.**

E. Da-Silva, L. Barthelmebs et J. Baudart

Publié dans *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(6), 5690-5700

Cet article décrit la mise au point d'un biocapteur permettant la détection du genre *Vibrio*, sans étape d'amplification par PCR. L'outil développé cible spécifiquement l'ARNr 16S et est basé sur un format d'hybridation « sandwich » utilisant une sonde capture immobilisée au fond des puits d'une microplaque et une sonde signal marquée. Une méthode de détection par chimiluminescence a été sélectionnée. Dans un premier temps, les sondes conçues ont été validées à l'aide de courts ADN synthétiques appelés PC (Positive Control). Le signal obtenu est proportionnel à la concentration en cible dans une gamme de concentration allant de 0,1 à 2,5 nmol.L⁻¹ et la limite de détection est de 0,1 nmol.L⁻¹. Des ARN totaux extraits à partir de 31 souches bactériennes de collection ont ensuite permis de contrôler la spécificité des sondes. L'outil développé permet d'obtenir une nette discrimination entre les 21 souches de *Vibrio* et les 10 souches de non *Vibrio* testées ainsi qu'une limite de détection de 5 ng.μL⁻¹ d'ARN total préalablement fragmentés. Le biocapteur à ADN a finalement été appliqué avec succès à l'analyse d'échantillons environnementaux naturellement ou artificiellement contaminés. Afin d'optimiser les conditions de travail, la stabilité du test et le temps d'analyse ont également été étudiés. Nous avons démontré que les microplaques peuvent être préalablement fonctionnalisées avec les sondes capture et conservées un mois à 4°C sans aucun tampon dans les puits, permettant ainsi une nette réduction du temps d'analyse.

Development of a PCR-free DNA-based assay for the specific detection of *Vibrio* species in environmental samples by targeting the 16S *rRNA*

E. Da-Silva^{1,2} · L. Barthelmebs¹  · J. Baudart²

Received: 27 July 2016 / Accepted: 29 November 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract A novel PCR-free DNA-based assay was developed for the detection of *Vibrio* spp. A sandwich hybridization format using an immobilized capture probe and a labeled signal probe was selected and combined with chemiluminescent method for the detection of the RNA target. In a first step, probes were validated using positive controls (PCs). A linearity was observed between 0.1 and 2.5 nM of PC, and detection limit was determined as 0.1 nM. In a second step, specificity was checked by using RNA extracted from a panel of 31 environmental bacterial strains. Detection limit of 5 ng μL^{-1} of total fragmented RNA was obtained, and the assay allowed a good discrimination between the 21 *Vibrio* and the 10 non-*Vibrio* strains tested. Finally, the DNA-based assay was successfully applied to analysis of spiked and natural environmental samples. Stability and analysis time of the DNA-based assay were also investigated to optimize working conditions. We demonstrated that microplates can be coated beforehand with capture probe and stored at 4 °C without any buffer in wells for at least 30 days. The use of the pre-made

plates enables the assay to be completed in 2 h. The developed assay appeared as an interesting tool to determine the presence of bacteria in environmental samples.

Keywords PCR-free · DNA-based assay · *Vibrio* detection · Sandwich hybridization assay · Chemiluminescence · Environmental analysis

Introduction

Currently, the water resource is regularly monitored for its bacteriological quality through the detection of fecal indicator bacteria such as *Escherichia coli*, total coliforms, and Enterococci using culture-based methods. Nevertheless, a large diversity of non-fecal pathogenic bacteria is widely distributed in aquatic environments and is potentially harmful for humans and animals. Moreover, due to environmental stresses, microorganisms may enter into a viable but non-culturable cell (VBNC) state becoming undetectable using cultural methods. This physiological state has been described for several pathogenic and non-pathogenic bacteria, including species belonging to the *Vibrio* genus (Oliver 2005). This genus, composed of more than 100 species (Romalde et al. 2014), is ubiquitous and abundant in aquatic ecosystems, principally in marine and estuarine waters (Narracci et al. 2014). These bacteria can survive either in the water column or in sediments and also associated to plankton, mainly due to their capability of biofilm formation (Shikuma and Hadfield 2010). Their occurrence in aquatic environments is correlated with several parameters, water temperature and salinity being the most important (Lutz et al. 2013). Furthermore, several studies have demonstrated that *Vibrio* prevalence could be impacted by human activities (Okoh et al. 2015). Forty-four years of monitoring in the Coastal North Sea revealed an increase in

Responsible editor: Gerald Thouand

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-8193-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ L. Barthelmebs
barthelm@univ-perp.fr

¹ Biocapteurs Analyses Environnement, Université Perpignan, Via Domitia, 66860 Perpignan, France

² CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, Sorbonne Universités, UPMC Univ. Paris 06, F-66650 Banyuls/Mer, France

prevalence of vibriosis correlated with elevated water temperature as a consequence of global climate change (Vezzulli et al. 2012).

Among *Vibrio* species, 12 are known to be human pathogen, including *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* as the most notable and important for public health (Tarr et al. 2007). Several other species are considered as pathogens for aquaculture, such as *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, and *V. vulnificus* that infect fish, *Vibrio penaeicida* and *Vibrio nigripulchritudo* infecting shrimps, and *Vibrio splendidus* related strains and *Vibrio aestuarianus* that are shellfish pathogens (Frans et al. 2011; Vezzulli et al. 2015; Walling et al. 2009; Goarant and Merien 2006). During the last decade, food-borne infections caused by the ingestion of uncooked shellfish contaminated with human pathogen *Vibrio* have significantly increased, especially in the USA, Canada, Asia, and India. While the incidence of these bacteria is currently considered as relatively low in Europe, the potential risk associated with *Vibrio* infections must be taken seriously, due to their emergence in some European countries (Le Roux et al. 2015). These last years, with the development of aquaculture, vibriosis has become one of the major causes of biological loss, particularly in France for oyster production (Petton et al. 2015; Samain and McCombie 2008). Mass mortality outbreaks caused by *Vibrio* particularly affect early larval stages and may lead to the decimation of entire populations, becoming one limiting factor for the viability of this economic activity (Thompson et al. 2004). However, even if these significant losses in aquaculture can be attributed to the presence of pathogenic agents in seawater, these pathogens are routinely detected in animals but rarely in harvesting waters. Therefore, anticipation of the biological resource contamination is not possible.

Current standardized methods for *Vibrio* detection and quantification are based on bacteria culture on specific agar media followed by colony counting. These methods are time consuming since 2–3 days are required to obtain the initial results, and at least 7 days are necessary to confirm positive results (Cai et al. 2006). Moreover, the ability of *Vibrio* to enter into VBNC state may lead to an underestimation of the viable cell number or a failure to isolate pathogens from the sample (Griffitt et al. 2011).

A wide range of techniques based on molecular methods have replaced the cumbersome microbiological analysis by targeting specific genetic markers. Within the last years, PCR-based methods have been set up for the detection, quantification, and differentiation of several bacteria (Oliveira et al. 2005; Frahm and Obst 2003; Clifford et al. 2012) and were applied to the identification of different *Vibrio* species, such as

V. vulnificus, *V. cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio coralliilyticus*, and *V. aestuarianus* (Tall et al. 2012; Saulnier et al. 2009; Pollock et al. 2010; Garrido-Maestu et al. 2015).

More recently, DNA-based sensors have been proposed as an alternative and effective technique for the detection of DNA or RNA sequences specific to microorganism species (Paniel et al. 2013). These kinds of sensors offer several advantages compared to PCR methods. They could allow the direct detection of genetic markers bypassing the nucleic acid amplification step and thus reducing the drawbacks linked to PCR inhibitors frequently detected in environmental and food samples. Moreover, by incorporating oligonucleotide probes immobilized on a surface, DNA-based sensors have the potential to speed the detection of nucleic acid targets and to increase the specificity and sensitivity of the analysis. To the best of our knowledge, such analytical devices reported for the detection of *Vibrio* bacteria have been mainly developed for the pathogenic *V. cholerae* species (Low et al. 2012; Patel et al. 2013, 2015; Liew et al. 2015; Yu et al. 2015). Nevertheless, most of these DNA-based sensors targeted DNA amplified through a PCR reaction, limiting the interest of these assays.

In the present study, a novel PCR-free DNA-based assay for the detection of *Vibrio* spp. has been investigated. The developed analytical tool was based on a sandwich hybridization assay in which RNA, as the nucleic acid target, was bound between an immobilized capture probe and a labeled signal probe. The hybridization complex was then revealed by an enzymatic system, leading to a chemiluminescent signal proportional to the entrapped target. Targeting 16S *rRNA* will allow not only the detection of culturable *Vibrio* but also the detection of *Vibrio* cells in VBNC state (Coutard et al. 2005; Schauer et al. 2015). Designed probes were first validated with positive control (PC), and detection limit was determined. Then, nucleic acids extracted from a panel of bacteria were used to assess the specificity of the probes, and finally, the assay was tested with environmental samples. Stability and storage conditions of the assay were also studied.

Material and methods

Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study were provided by various bacterial culture collections (Microbial Observatory of the Laboratoire Arago (MOLA, Banyuls-sur-Mer, France), American-type culture collection (ATCC), and Collection de l'Institut Pasteur (CIP, Paris, France) (Supplementary data—Table 1). All environmental strains have been previously identified from the 16S *rDNA*. Marine strains were grown at 25 °C in Marine Broth medium 279110 (MB, Difco™ Becton, Dickinson and Co., USA). *E. coli*, *Citrobacter*, and

Pseudomonas strains were cultivated in Tryptic Soy Broth (TSB) (Biokar, France).

Total RNA extraction from pure cultures

Twenty-one *Vibrio* and 10 non-*Vibrio* strains were used to evaluate the specificity of the assay. Each strain was grown overnight in appropriate medium at 25 °C. In order to optimize the amount of extracted RNA, 1 mL of the overnight culture was added to 500 µL of fresh medium and incubated 4 h at 25 °C before total RNA extraction. Then, 1.5 mL of each culture was centrifuged at 8000×g for 5 min at 4 °C. Total RNA was extracted with Tri-reagent (Sigma, France) as reported by Chomczynski and Sacchi (2006) and then re-suspended in 50 µL DNase-RNase free water. RNA integrity and concentration were checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer. Then, RNA extracts were fragmented using a 10× fragmentation buffer (100 mM ZnCl₂, 100 mM Tris-HCl; pH 7) (Gescher et al. 2008). Briefly, 1 µL of 10× buffer was added to 10 µL of RNA, and samples were incubated at 70 °C for 15 min. Fragmentation reaction was stopped with 1 µL of EDTA 0.5 M, pH 8, and samples were stored at -80 °C until use.

Environmental samples collection and total RNA extraction

Analytical performances of the assay were tested with environmental samples naturally or artificially contaminated by *Vibrio* spp. Samples were collected at a French northwestern Mediterranean lagoon dedicated to oyster culture (Leucate) and at a northwestern Mediterranean marine open bay (SOLA) (42° 29 N, 03° 08 E) located ~500 m offshore of Banyuls sur-Mer city, France. A seawater sample (SW) was collected at SOLA and a phytoplankton sample (PK) was collected at Leucate.

Fifty liters of SW collected at SOLA were concentrated using an ultrafiltration cartridge (Hemoflow HF80S, Fresenius, Bad Homberg, Germany) with a 20 kDa molecular weight cutoff. The cartridge was back-flushed with 1 L of elution buffer prepared with the ultra-filtrated water of the sampling site, 0.01% sodium hexametaphosphate (NaPP, Sigma, France), and 0.5% Tween 80 (Sigma, France). Twenty-five milliliters of concentrate was filtered on 0.4-µm polycarbonate filters. Total RNA extraction was directly performed on those filters using the Tri-reagent method. Then, this total RNA extract, named SW RNA, was spiked with total RNA extracted from a pure culture of *V. splendidus* (CIP 102893). Each spiked sample was composed of 2 µL of SW RNA in a final volume of 10 µL. SW RNA was spiked with different quantities of *V. splendidus* RNA to obtain final concentrations of *V. splendidus* RNA ranging from 0 to 100 ng µL⁻¹. A control was performed with different

concentrations of *V. splendidus* RNA alone. All the samples were tested in the developed assay.

PK sample was collected at Leucate lagoon using a plankton net (50 µm) allowing the concentration of approximately 25 m³ of water. The net was immersed for 5 min in water at a very low speed of two knots. The phytoplankton from the net was collected in polyethylene buckets, and a total of 400 mL of concentrate was recovered after sampling. Ten milliliters of the concentrate were subsampled and filtered on 0.4-µm polycarbonate filters. Total RNA extraction was performed on those filters as described above. In parallel, in order to estimate the number of *Vibrio* cells in the PK concentrate, 100 µL of concentrate was spread at 10-fold dilutions on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar. Five replicates were performed for each dilution and the number of CFU mL⁻¹ was determined after 24 h of incubation at 25 °C.

For all environmental samples, RNA integrity and concentration were checked using the Agilent 2100 Bioanalyzer. Before analysis, RNA was fragmented as previously described and stored at -80 °C.

Oligonucleotide probes design and use

Capture and signal probes were both designed to hybridize with two adjacent sequences located on the 16S *rRNA* of all *Vibrio* species. The probes were checked in silico for the specific recognition of all the members of *Vibrio* genus using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) against GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and Silva (<http://www.arb-silva.de/>) databases. For the two probes, no perfect match was observed in silico with non-*Vibrio* species. Probes biophysical properties were analyzed using the Oligonucleotide Properties Calculator software (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). The 35-bp capture probe was biotinylated in 5', and the 35-bp signal probe was labeled with a digoxigenin (DIG) in 3' (Table 1).

Table 1 Synthetic DNA probes and positive control used for the developed DNA-based assay

Oligonucleotide name	Sequence (5'-3')	Modification
VibCap	TTGAGCCCCGGGCT TTCACATCTGAC TTAATGAAC	5' Biotin
VibSig	ACCTGCATGCGCTT TACGCCAGTAA TTCCGATTA	3' Digoxigenin
PC	TAATCGGAATTACT GGGCGTAAAGCG CATGCAGGTG TTCATTAAGTCAGA TGTGAAAGCCCC GGGCTCAA	None

A 70 bp synthetic oligonucleotide corresponding to the complementary strand of both capture and signal probes was used as PC. Probes and PC were synthesized by Microsynth (Switzerland) and were diluted in DNase-RNase free water to obtain 100 μM stock solutions. Capture probe solutions were prepared at the appropriate concentration in 0.1 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl, pH 7.6 and were denatured by 3 min at 90 °C, 2 min at 4 °C, and then 5 min at room temperature, before use.

DNA-based assay development for *Vibrio* spp. detection

NeutrAvidin was purchased from Thermo Fischer Scientific and all the buffer components from Sigma (France). Hammerstein-grade casein was purchased from MP Biomedicals (France), and anti-digoxigenin-horseradish peroxidase conjugate (anti-DIG-HRP) was purchased from Roche (France). All solutions were prepared with diethyl pyrocarbonate-treated distilled water to inactivate RNase enzymes in prepared solutions.

Protocol was adapted from Paniel and Baudart (2013). MaxiSorp™ microplates (Nunc, Denmark) were coated with 100 μL of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NeutrAvidin in HEPES 0.1 M, pH 7.2, for 1 h at room temperature. Then, the NeutrAvidin excess was eliminated by three washing steps using 1 \times PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.76 mM KH_2PO_4 ; pH 7.4).

Three strategies were then assessed. In the first one, pre-hybridization mix containing 25 μL of 4 \times hybridization buffer (4 \times HYB buffer: NaCl 0.3 M, Tris 80 mM, SDS 0.04%; pH 8), 10 μL of 1 μM denatured capture probe, 10 μL of 1 μM labeled signal probe, 10 μL of target (i.e PC or RNA or fragmented RNA), and 45 μL of ultra pure water was incubated for 10 min at 65 °C. Then, 100 μL of this pre-hybridization mix was added to the wells, and the microplate was incubated for 30 min at 46 °C. Wells were washed three times with 1 \times HYB buffer. Unspecific sites were blocked with 1% Hammerstein casein in binding buffer (PBS 1 \times , 1 mM MgCl_2 , 0.01% Tween 20; pH 7.4) for 45 min at room temperature, and casein excess was removed by three washing steps using 1 \times HYB buffer.

In the second strategy, pre-hybridization mix containing 25 μL of 4 \times HYB buffer, 10 μL of 1 μM capture probe, 10 μL of target, and 55 μL of ultra pure water was incubated for 10 min at 65 °C. One hundred microliters of the pre-hybridization mix was added to each well, and the microplate was incubated for 30 min at room temperature. Wells were washed 3 times with 1 \times HYB buffer, and unspecific sites were blocked as previously described. One hundred microliters of 0.1 μM signal probe was added to the microplate which was then incubated for 30 min at 46 °C. Wells were then washed three times with 1 \times POP buffer (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.1 M; pH 6.45).

In the third strategy, 100 μL of 0.1 μM denatured capture probe was added to each well and the microplate was incubated for 30 min at room temperature. Wells were washed three times with 1 \times HYB buffer. Unspecific sites were blocked as previously described. Pre-hybridization mix containing 25 μL of 4 \times HYB buffer, 10 μL of 1 μM labeled signal probe, 10 μL of target, and 55 μL of ultra pure water was incubated for 10 min at 65 °C. One hundred microliters of the pre-hybridization mix was added to the wells, and the microplate was incubated for 30 min at 46 °C. Wells were then washed three times with 1 \times POP buffer.

Then, the revelation of the sandwich hybridization was performed in the same way for the three strategies. One hundred microliters of anti-DIG-HRP conjugate at 50 mU mL^{-1} in PBS-T-BSA (PBS 1 \times , BSA 0.1%, Tween 20 0.05%; pH 7.4) was added to the wells, and the microplate was incubated for 20 min at room temperature. Wells were washed using 1 \times POP buffer.

In this work, two detection methods were used. For colorimetric detection, 100 μL of ready-to-use 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (TMB) (Sigma, France) was added to the wells, and after 15 min of incubation at room temperature, optical density was measured at 630 nm using the Multiskan Ascent™. For chemiluminescent detection, 100 μL of luminol- H_2O_2 (Luminata forte™ ELISA HRP Substrate, Merck Millipore, France) was added to the wells, and after 5 min of incubation at room temperature, luminescence was measured using the Fluoro-Luminoskan Ascent™ FL (Thermo Scientific, France). For the specificity tests, all the values were standardized as followed: standardized value = measured value / 1 nM of PC value.

Storage and stability study of the DNA-based assay

To minimize experimental variations, all the solutions were prepared at day 0 and used until the end of the experiment. NeutrAvidin, capture probe, and casein were successively added to the wells of several strip plates following the third protocol described above. Then, two storage conditions were tested. Strip plates were directly stored at 4 °C with casein solution inside each well, or they were washed to eliminate the excess of casein and stored at 4 °C without any buffer. For both conditions, a lid was placed on the top of each plate, which was then packed inside an aluminum foil. Then, hybridization and enzymatic revelation were carried out at day 0 as the reference point and at different times during 30 days (d_1 , d_2 , d_3 , d_4 , d_7 , d_8 , d_{10} , d_{14} , d_{16} , d_{21} , and d_{30}) as previously described. Colorimetric detection was used. Results were expressed as follows: (value at $d_x \times 100$) / value at d_0 with d_x as the day of the experiment (d_1 to d_{30}).

Results and discussion

Design strategy of the DNA-based assay

In this work, sandwich hybridization format was chosen to optimize the recognition of the target and thus to improve the specificity of the assay. Three different hybridization strategies were investigated to determine the optimal working conditions. In the first strategy (Fig. 1a), pre-hybridization was carried out by mixing together all the components. Then, this mix was added to the microplate wells for NeutrAvidin binding. In the second strategy (Fig. 1b), the target was firstly pre-hybridized with the capture probe. This solution was then added to the wells for NeutrAvidin binding and followed by signal probe addition. In the third strategy (Fig. 1c), capture probe was immobilized alone inside the wells. Pre-hybridization between the target and the signal probe was performed, and then this mix was added to the wells.

Comparison of the three strategies was performed using 50 nM of PC. For all experiments, the signals were at least 3-fold higher than the negative control without PC. The best response was achieved when the denatured capture probe was immobilized alone in each well. This third strategy allowed a signal response 10- and 4-fold higher than the second and the first strategy, respectively (data not shown). These

lower results could be explained by the steric hindrance of the biotinylated complex that could decrease the binding to NeutrAvidin, and highlight the importance of the binding step between the biotinylated capture probe and NeutrAvidin to optimize the signal response of our assay. According to those results, the third strategy (Fig. 1c) was selected for subsequent experiments.

Validation of the DNA-based assay

In order to assess the sensitivity of our system, a calibration curve was performed using PC. Chemiluminescent responses obtained for the different concentrations of PC from 0.1 to 25 nM are shown in Fig. 2. As expected, the intensity of the responses was proportional to the PC concentration. Moreover, the results showed that the chemiluminescent responses were linear over the range from 0.1 to 2.5 nM of PC (Fig. 2b). The correlation coefficient (R^2) value was 0.997, and the relative standard deviation (RSD) average of 8% indicated a good reproducibility of the assay. Due to the low RSD, the detection limit of the assay was determined, based on the threshold value of three times the background signal, as 0.1 nM corresponding to $2.17 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ of PC.

After optimizing the experimental parameters with PC, assays were performed with $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ of fragmented and non-

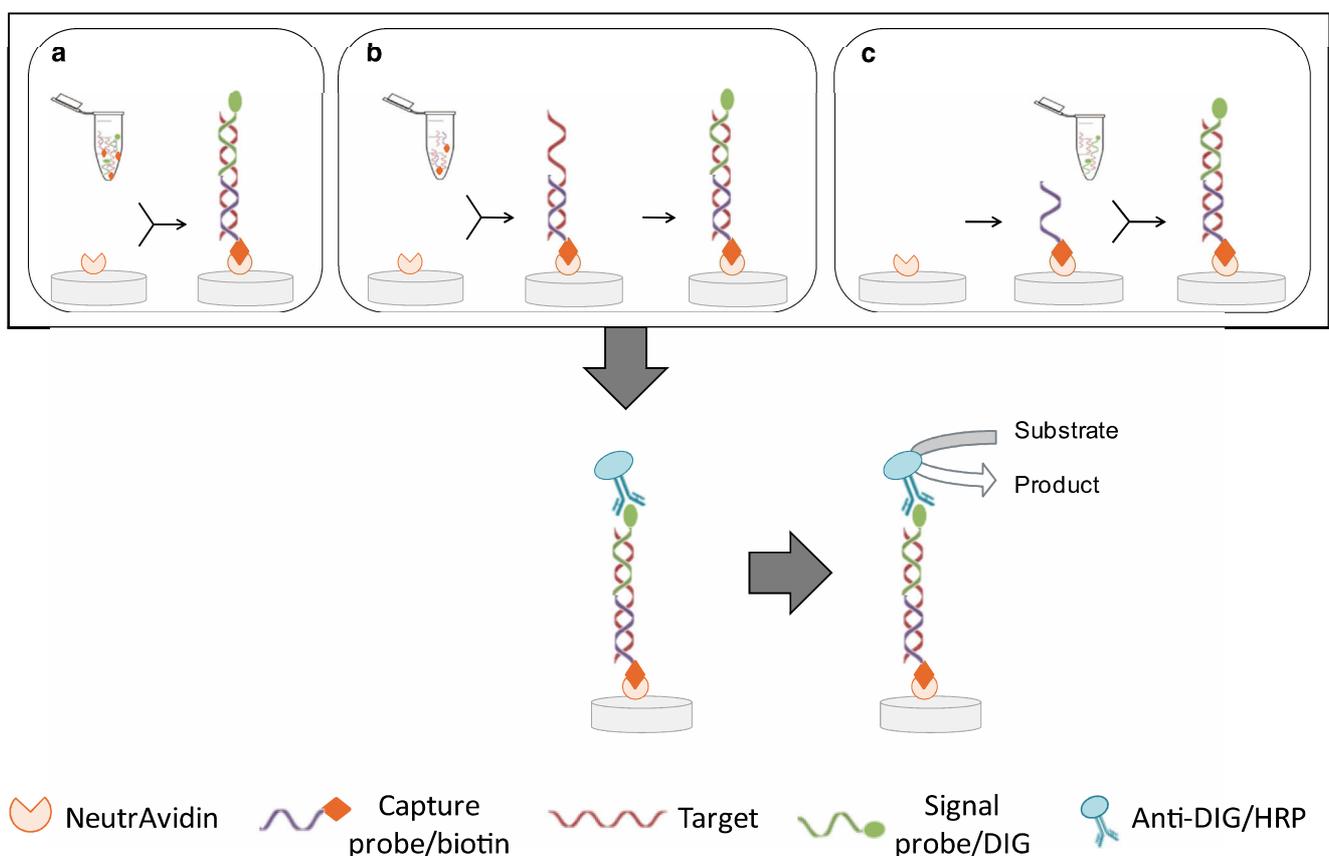


Fig. 1 Schematic illustration of the sandwich hybridization assay. **a** First strategy; **b** second strategy; **c** third strategy

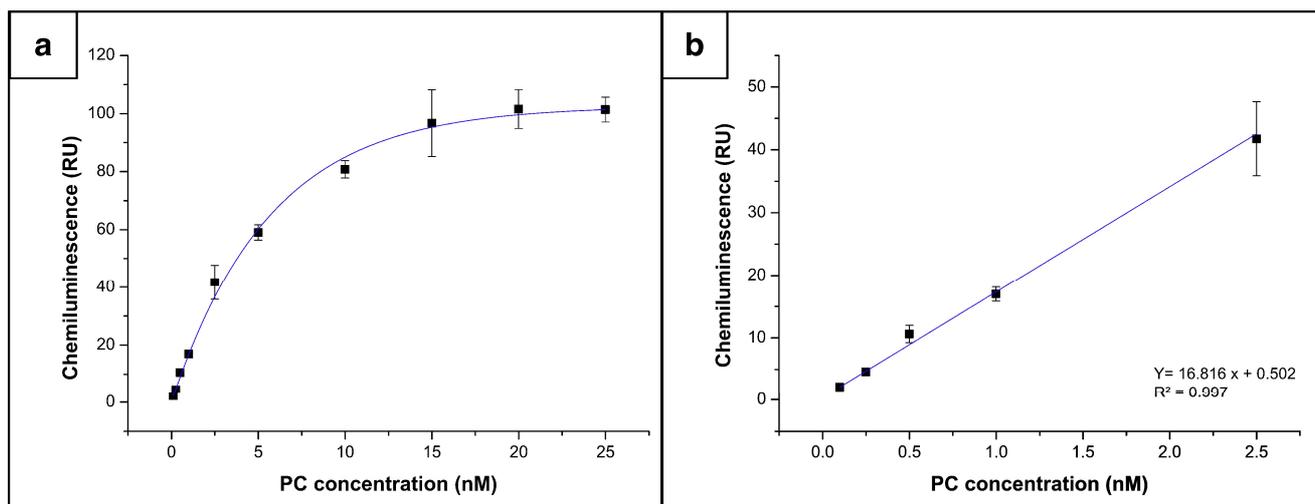


Fig. 2 Calibration curve (a) and linear part of the calibration plot (b) obtained in the presence of different concentrations of PC with the DNA-

based assay using chemiluminescence detection. Error bars are standard deviations of the mean with $n = 3$

fragmented RNA extracted from three different species belonging to the *Vibrio* genus (*V. splendidus* ATCC 33125, *Vibrio pomeroyi* CIP 108273, and *Vibrio crassostreae* CIP 108327). For the three RNA samples, the obtained responses were 7- to 10-fold higher with fragmented RNA than with non-fragmented indicating a positive effect of the fragmentation step on the RNA target (data not shown). For subsequent experiments, RNA was always fragmented before analysis.

Various concentrations of total RNA from *V. splendidus*, used as reference strain, were assessed to validate the assay with nucleic acid target and to determine the optimal RNA concentration to be used for the specificity tests. As previously shown with PC, the intensity of the chemiluminescent responses was proportional to the total RNA concentration. Linear responses were observed between 1 and

100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ of total RNA, with a R^2 value of 0.995 (Fig. 3). Based on the threshold value of 3 times the background signal, the detection limit was determined as 5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ of total RNA which was 2300 times higher than the detection limit observed with PC (2.17 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$). This observation could be explained by the proportion of target. Indeed, the targeted 16S *rRNA* only represents a fraction of the total RNA. Moreover, instead of the PC which is a short 70-bp linear sequence, 16S *rRNA* is longer (1500 bp) and can present some secondary and tertiary structures as hairpins that can interfere with probes hybridization.

For 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, the measured chemiluminescence was 4-fold higher than those measured for the detection limit value. Similar results were obtained for the two other *Vibrio* strains *V. pomeroyi* and *V. crassostreae* (data not shown). Thus, 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ of total RNA is sufficient to clearly detect *Vibrio* RNA in the sample.

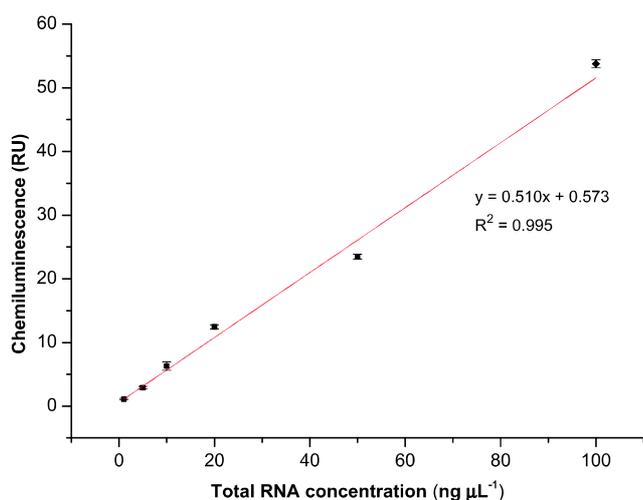


Fig. 3 Calibration curve obtained for a range of total RNA concentration from *Vibrio splendidus* with the DNA-based assay using chemiluminescence detection. Error bars are standard deviations of the mean with $n = 3$

Specificity evaluation of the DNA-based assay

Regarding our previous results obtained with total RNA, a concentration of 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ was retained to perform specificity tests. In order to standardize the chemiluminescent responses between experiments, the value obtained for 1 nM of PC was used as the reference.

Twenty-one *Vibrio* strains belonging to seven different clades (Splendidus, Harveyi, Corallilyticus, Mediterranei, Halioticoli, Rumoiensis, and Anguillarum clades) and ten strains belonging to ten others bacterial genera were assessed (Fig. 4).

The results showed that a significant response was observed for the 21 *Vibrio* strains tested. The lower signal was obtained for *Vibrio natriegens*, with a luminescence value 55 times higher than the background signal. All the other *Vibrio* strains tested gave higher signals, with a coefficient factor varying from 1.1 to 6.6 of the signal obtained for

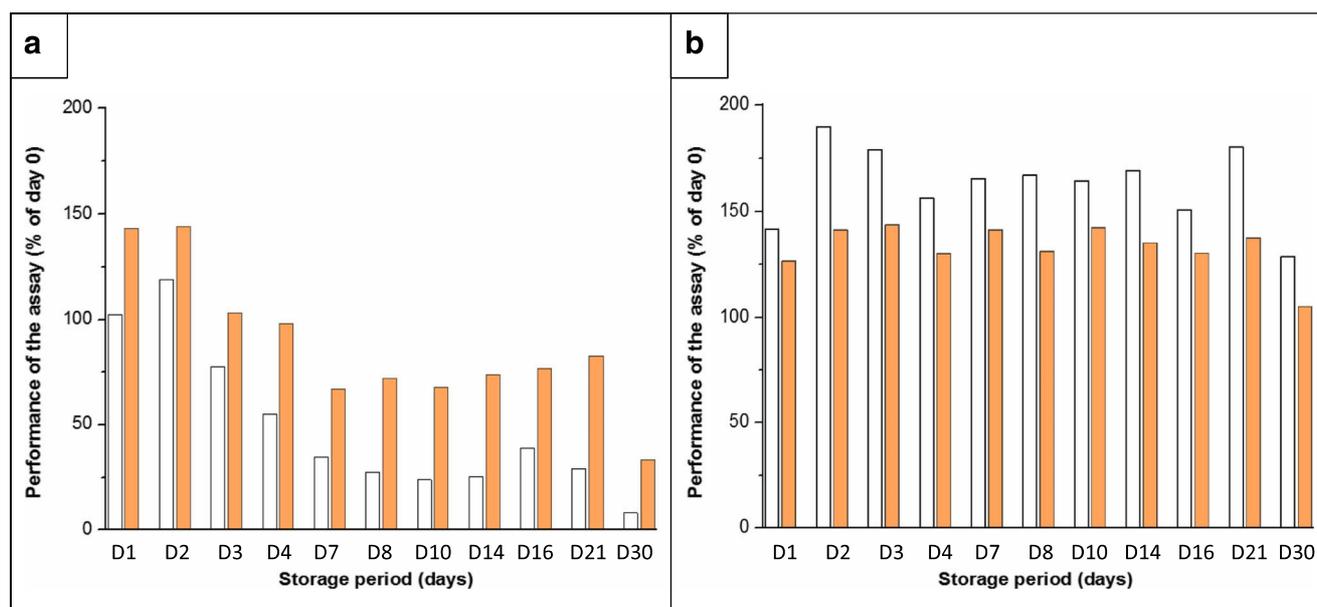


Fig. 5 Stability study of the microplates coated with the capture probe, stored up to 30 days at 4 °C **a** with casein and **b** without casein in wells. Hybridization, using 50 nM of PC (white bars) or 250 nM of PC (orange bars) and 0.1 μM signal probes, and enzymatic revelation using

colorimetry detection were performed just after coating (day 0) or after storage for several days (D) at 4 °C (D1 to D30). Values were expressed using day 0 as the reference point

of 26%. Furthermore, for both PC concentrations, the measured values were also higher than those obtained at the same time for microplates stored with casein. We could hypothesize that an increase of casein adsorption on well surface could occur over time leading to a decrease in the measured signal from d_2 to d_{30} . The second storage condition appeared as the better way to preserve microplates. Indeed, the assay components were stable for at least 30 days, and the signal stables over time. These results demonstrated that microplates can be coated beforehand and stored at 4 °C without casein until use allowing a reduction of 3 h in experiment time. The use of pre-made plates enables the assay to be completed in 2 h.

Environmental sample analysis

To our knowledge, few studies have reported the application of DNA-based biosensors for environmental samples analysis. However, when biosensors are developed for in field application, this step is essential. For complex samples, the performances of such devices could be different from those obtained with bacterial strains growing under laboratory conditions due to matrix interferences. Thus, our developed assay was assessed with two different environmental samples (seawater and phytoplankton) to evaluate the matrix effect and to validate the suitability of the method for *Vibrio* detection.

First assay was assessed on SOLA SW sample. A previous analysis by a TaqMan qPCR targeting the 16S *rDNA* gene of

Vibrio spp. was performed on total extracted DNA. No genome unit (GU) was detected in this sample, indicating that the concentration of *Vibrio* spp. estimated by qPCR was under the quantification limit of the assay (833 GU L⁻¹ of SW) (personal data). In a second step, SW RNA was analyzed using the developed DNA-based assay. To test the matrix effect, a same quantity of SW RNA was spiked with known concentrations of total RNA extracted from *V. splendidus* ranging from 0 to 100 ng μL⁻¹, and the results were compared with those obtained with total RNA of *V. splendidus* alone (Fig. 6a). The analysis performed on SW RNA without addition of *V. splendidus* RNA showed a positive signal. The positive signal was linked to the presence of RNA from *Vibrio* in the sample. This genus is known to be a common inhabitant of the coastal marine areas, as demonstrated by a recent study that showed that *Vibrio* abundances at SOLA site ranged from 7 to 2.7 × 10⁴ CFU L⁻¹ over the year (unpublished work). Interestingly, SW RNA sample without spiked RNA was positive for *Vibrio* spp. analysis using the reported device but negative using qPCR. This negative result could be explained by the dilution procedure applied to extracted DNA before qPCR analysis, required to limit the matrix inhibitors effect, but leading to a decrease of sensitivity. The linearity of the chemiluminescent response was measured for the SW RNA spiked samples and also for the *V. splendidus* RNA alone, given R^2 values of 0.997 and 0.989, respectively (data not shown). The signals measured in the spiked samples were 2.2- to 7.2-fold higher than those measured with the RNA

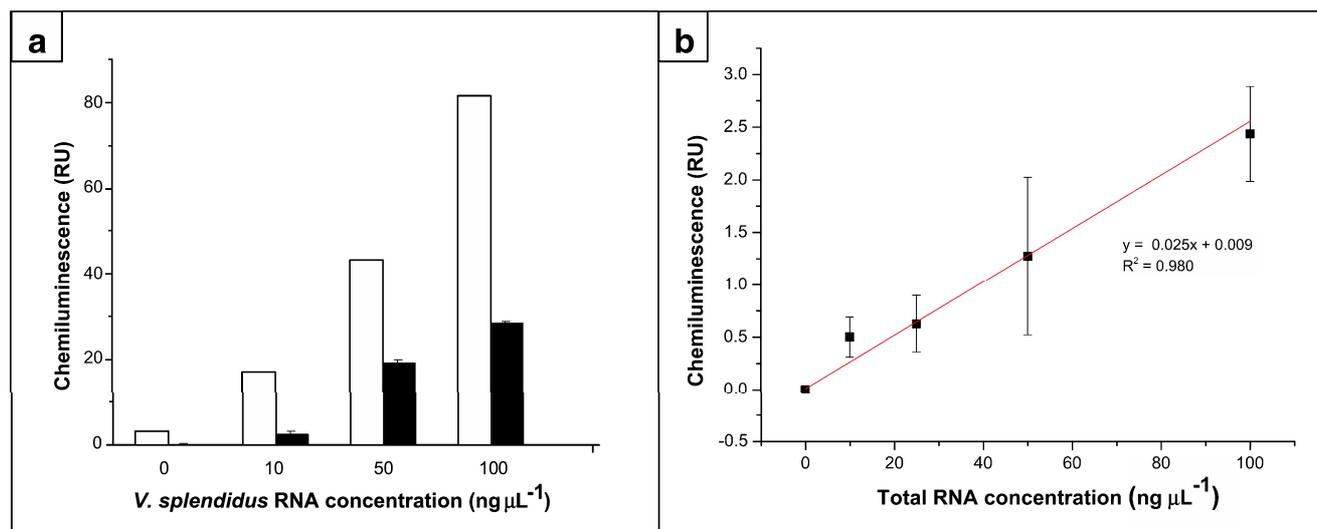


Fig. 6 Environmental sample analysis using the DNA-based assay. **a** Matrix effect of SOLA samples was assessed by comparison of *Vibrio splendidus* RNA analysis (black bars) with SW RNA analysis (white bars), alone (0), or spiked with different concentrations of *V. splendidus*

RNA (10, 50, and 100 ng μL⁻¹) using chemiluminescence detection. **b** RNA extracted from Leucate PK samples were analyzed using chemiluminescence detection. Error bars are standard deviations of the mean with $n = 3$

from *V. splendidus* alone confirming the detection of environmental population of *Vibrio* already present in SW sample using the reported device.

PK samples from Leucate were also assessed since *Vibrio* bacteria are known to be tightly associated with phytoplankton (Huq et al. 2005; Turner et al. 2009) and use the phytoplankton extracellular matrix as nutrient sources (Thompson et al. 2004). As shown in Fig. 6b, a linear relationship was observed between the measured chemiluminescence and the total RNA concentrations of PK RNA. The R^2 value was 0.980, indicating that our system allowed the specific detection of *Vibrio* RNA from a total RNA sample extracted from an environmental sample in the range of 10 to 100 ng μL⁻¹. However, important standard deviations were observed that could be linked to the sample matrix. These samples were collected by filtering 25 m³ of seawater to concentrate phytoplankton. Phytoplankton can produce exopolysaccharides (Passow 2002), and some of these complex molecules could be extracted with RNA. Polysaccharides are well known as PCR inhibitors (Schrader et al. 2012). They have the ability to co-precipitate with nucleic acids, reducing the ability to resuspend the precipitated RNA (Butot et al. 2007). Furthermore, they can cross-link with nucleic acids and change their chemical properties (Opel et al. 2010). In our case, polysaccharides may contribute to heterogeneous RNA solutions and may hide some hybridization sites. This could explain the differences observed between triplicates. By consequence, volumes of filtered water have to be optimized as well as the filtration method before analysis with the assay.

In order to facilitate evaluation of the assay performance, a detection limit corresponding to a number of cells per sample volume has been estimated for the PK sample. For this

sample, *Vibrio* cell number has been determined by plate counting on TCBS agar as 6.17×10^4 CFU mL⁻¹ of concentrate. Thus, the *Vibrio* cell number in the 400 mL concentrate was 2.5×10^7 . Since the concentrate has been obtained by filtering 25 m³ of water, the developed tool allows the detection of 1000 CFU L⁻¹.

Conclusion

In this paper, a PCR-free DNA-based assay for the detection of *Vibrio* spp. in environmental samples was developed. The resulting assay showed an excellent specificity since a high discrimination was observed between the 21 *Vibrio* strains and the 10 closely related genera tested. The combination of sandwich hybridization format and chemiluminescent detection allowed a direct analysis of the extracted RNA, suppressing the PCR amplification step routinely performed in such analytic techniques. Detection limits of 0.1 nM and 5 ng μL⁻¹ were obtained with synthetic probes and total RNA respectively, indicating a good sensitivity of the reported system.

To optimize experiment time, microplates were coated beforehand and various storage conditions were assessed. Storage at 4 °C without casein not only showed that components were stable for at least 30 days but also decreased the analysis time to 2 h, allowing a rapid detection of *Vibrio* spp. using the developed device.

The results with spiked and natural environmental samples indicated that the proposed method appeared as an interesting tool to determine the presence of bacteria in aquatic samples. In future works, optimization of sample preparation and transfer towards an electrochemical format will be performed in

order to improve *Vibrio* detection in aquatic samples. Furthermore, correlation between signal intensities and cell counts from environmental samples will be investigated.

Acknowledgements Elise Da-Silva is very grateful to the University of Perpignan Via Domitia, France for its financial support through Doctoral School 305. We are thankful to the Service d'Observation du Laboratoire ARAGO for the sampling campaigns at SOLA. We also thank Christophe Canal and Léa Girard for the phytoplankton sampling at Leucate lagoon and Lisa Morales for her experimental contribution.

Compliance with ethical standards All authors agreed to be listed and have approved of the manuscript, its content, and its submission to Environmental Science and Pollution Research. It has not been submitted or published elsewhere, whether partly or fully. All authors are in agreement with the ethical rules of ESPR.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Anzai Y, Kim H, Park JY et al (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S *rRNA* sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563–1589. doi:10.1099/00207713-50-4-1563
- Butot S, Putallaz T, Sanchez G (2007) Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl Environ Microbiol* 73:186–192. doi:10.1128/AEM.01248-06
- Cai T, Jiang L, Yang C, Huang K (2006) Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 46:180–186. doi:10.1111/j.1574-695X.2005.00016.x
- Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581–585. doi:10.1038/nprot.2006.83
- Clifford RJ, Milillo M, Prestwood J et al (2012) Detection of bacterial 16S *rRNA* and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PLoS One* 7:e48558. doi:10.1371/journal.pone.0048558
- Coutard F, Pommepuy M, Loac S, Hervio-Heath D (2005) mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol* 98:951–961. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02534.x
- Frahm E, Obst U (2003) Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods* 52:123–131
- Frans I, Michiels CW, Bossier P et al (2011) *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention: pathogen profile of *Vibrio anguillarum*. *J Fish Dis* 34:643–661. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x
- Garrido-Maestu A, Chapela M-J, Vieites JM, Cabado AG (2015) *lolB* gene, a valid alternative for qPCR detection of *Vibrio cholerae* in food and environmental samples. *Food Microbiol* 46:535–540. doi:10.1016/j.fm.2014.09.012
- Gescher C, Metfies K, Medlin LK (2008) The ALEX CHIP—development of a DNA chip for identification and monitoring of *Alexandrium*. *Harmful Algae* 7:485–494. doi:10.1016/j.hal.2007.11.001
- Goarant C, Merien F (2006) Quantification of *Vibrio penaeicida*, the etiological agent of Syndrome 93 in New Caledonian shrimp, by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. *J Microbiol Methods* 67:27–35. doi:10.1016/j.mimet.2006.02.013
- Griffitt KJ, Norica NF, Johnson CN, Grimes DJ (2011) Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in the viable but nonculturable state using direct plate counts and recognition of individual gene fluorescence in situ hybridization. *J Microbiol Methods* 85:114–118. doi:10.1016/j.mimet.2011.02.006
- Huq A, Sack RB, Nizam A et al (2005) Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 71:4645–4654. doi:10.1128/AEM.71.8.4645-4654.2005
- Le Roux F, Wegner KM, Baker-Austin C, et al. (2015) The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Front Microbiol* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00830
- Letowski J, Brousseau R, Masson L (2004) Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J Microbiol Methods* 57:269–278. doi:10.1016/j.mimet.2004.02.002
- Liew PS, Lertanantawong B, Lee SY et al (2015) Electrochemical genosensor assay using lyophilized gold nanoparticles/latex microsphere label for detection of *Vibrio cholerae*. *Talanta* 139:167–173. doi:10.1016/j.talanta.2015.02.054
- Low K-F, Chuenrangsikul K, Rijiravanich P et al (2012) Electrochemical genosensor for specific detection of the food-borne pathogen, *Vibrio cholerae*. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1699–1706. doi:10.1007/s11274-011-0978-x
- Lutz C, Erken M, Noorian P et al (2013) Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2013.00375
- Narracci M, Acquaviva MI, Cavallo RA (2014) Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. *Environ Sci Pollut Res* 21:2378–2385. doi:10.1007/s11356-013-2049-3
- Okoh AI, Sibanda T, Nongogo V et al (2015) Prevalence and characterisation of non-cholerae *Vibrio* spp. in final effluents of wastewater treatment facilities in two districts of the Eastern Cape Province of South Africa: implications for public health. *Environ Sci Pollut Res* 22:2008–2017. doi:10.1007/s11356-014-3461-z
- Oliveira TCRM, Barbut S, Griffiths MW (2005) Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *Int J Food Microbiol* 104:105–111. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.008
- Oliver JD et al (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43:93–100
- Opel KL, Chung D, McCord BR (2010) A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* 55:25–33. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x
- Paniel N, Baudart J (2013) Colorimetric and electrochemical genosensors for the detection of *Escherichia coli* DNA without amplification in seawater. *Talanta* 115:133–142. doi:10.1016/j.talanta.2013.04.050
- Paniel N, Baudart J, Hayat A, Barthelmebs L (2013) Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. *Methods* 64:229–240. doi:10.1016/j.ymeth.2013.07.001
- Passow U (2002) Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 236:1–12. doi:10.3354/meps236001
- Patel MK, Ali MA, Srivastava S et al (2013) Magnesium oxide grafted carbon nanotubes based impedimetric genosensor for biomedical application. *Biosens Bioelectron* 50:406–413. doi:10.1016/j.bios.2013.07.006
- Patel MK, Ali MA, Krishnan S et al (2015) A label-free photoluminescence genosensor using nanostructured magnesium oxide for cholera detection. *Scientific Reports* 5:17384. doi:10.1038/srep17384

- Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* 6:205–222. doi:10.3354/aei00125
- Pollock FJ, Morris PJ, Willis BL, Bourne DG (2010) Detection and quantification of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* by real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl Environ Microbiol* 76:5282–5286. doi:10.1128/AEM.00330-10
- Romalde JL, Dieguez AL, Lasa A, Balboa S (2014) New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2013.00413
- Samain JF, McCombie H (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. Versailles: Quae Editions. 379 pp
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods* 77:191–197. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.021
- Schauer S, Jakwerth S, Bliem R et al (2015) Dynamics of *Vibrio cholerae* abundance in Austrian saline lakes, assessed with quantitative solid-phase cytometry: *V. cholerae* dynamics assessed with solid phase cytometry. *Environ Microbiol* 17:4366–4378. doi:10.1111/1462-2920.12861
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R (2012) PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113:1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Shikuma NJ, Hadfield MG (2010) Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Biofouling* 26:39–46. doi:10.1080/08927010903282814
- Tall A, Teillon A, Boisset C et al (2012) Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. strains. *J Appl Microbiol* 113:361–372. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05350.x
- Tarr CL, Patel JS, Puhf ND et al (2007) Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. *J Clin Microbiol* 45:134–140. doi:10.1128/JCM.01544-06
- Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA et al (2004) Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol* 70:4103–4110. doi:10.1128/AEM.70.7.4103-4110.2004
- Turner JW, Good B, Cole D, Lipp EK (2009) Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *The ISME journal* 3:1082–1092
- Vezzulli L, Brettar I, Pezzati E et al (2012) Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME journal* 6:21–30
- Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M et al (2015) Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*: ecology of *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* 17:1065–1080. doi:10.1111/1462-2920.12484
- Walling E, Vourey E, Ansquer D et al (2009) *Vibrio nigripulchritudo* monitoring and strain dynamics in shrimp pond sediments. *J Appl Microbiol*. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04601.x
- Wuyts J (2004) The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* 32:101D–1103. doi:10.1093/nar/gkh065
- Yu CY, Ang GY, Chan KG et al (2015) Enzymatic electrochemical detection of epidemic-causing *Vibrio cholerae* with a disposable oligonucleotide-modified screen-printed bisensor coupled to a dry-reagent-based nucleic acid amplification assay. *Biosens Bioelectron* 70:282–288. doi:10.1016/j.bios.2015.03.048

Résultats complémentaires

Afin de permettre une meilleure dtection des ARNs, ceux-ci sont fragmentés à l'aide d'un tampon de fragmentation classiquement utilisé pour la préparation de librairies d'ARN avant leur séquençage. Comme cela est décrit dans la publication présentée ci-dessus, 1 µL de tampon (ZnCl_2 100 mmol.L⁻¹ ; Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ ; pH = 7) est ajouté à 10 µL d'extrait d'ARN total puis la solution est incubée 15 min à 70°C. Le phénomène de fragmentation est arrêté par l'ajout de 1 µL d'EDTA à 500 mmol.L⁻¹, pH = 8. L'intégrité des ARNs totaux a été vérifiée avant l'application du protocole de fragmentation, les résultats étant présentés dans le chapitre I. Après application du protocole de fragmentation, la migration sur gel d'agarose 1,2 % des extraits d'ARNs totaux révèle la présence de trainées de faible poids moléculaire, indiquant une dégradation complète des ARNs et validant ainsi le protocole utilisé (**Figure III-14**).

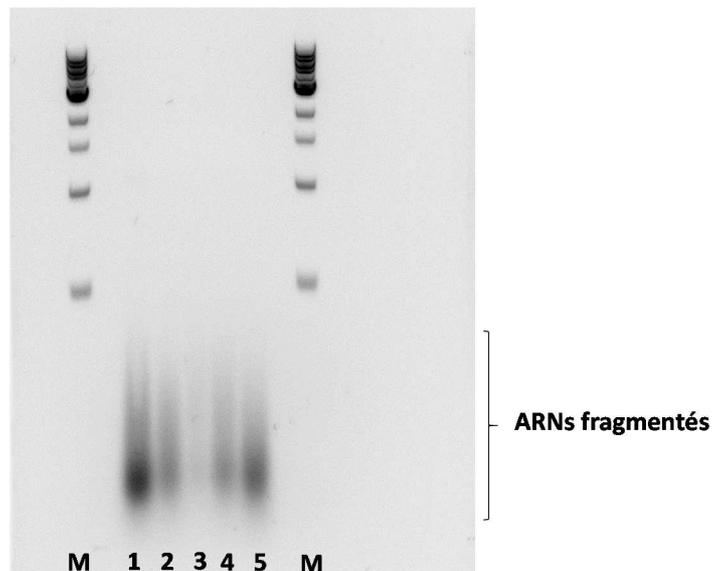


Figure III-14 : Exemple de migration sur gel d'agarose 1,2% des extraits d'ARNs totaux après application du protocole de fragmentation. Les pistes **M** correspondent au marqueur de poids moléculaire Quick Load DNA Ladder (New England Biolabs, 0,5-10 kb). Les autres pistes correspondent aux extraits d'ARN issus des souches **(1)** *V. gigantis* ; **(2)** *V. aestuarianus* ; **(3)** *V. mediterranei* ; **(4)** *V. pomeroyi* et **(5)** *V. splendidus* ATCC 33125.

III.2. Format d'hybridation compétitif

III.2.1. Détection en colorimétrie

III.2.1.1. Optimisation et calibration du système

Pour des raisons de coût et de rapidité d'analyse, l'ensemble des optimisations a été effectué en microplaques 96 puits, en détection colorimétrique. Afin d'obtenir des résultats reproductibles et d'améliorer la limite de détection du système, des optimisations du protocole précédemment utilisé en format « sandwich » ont été nécessaires. Les paramètres optimisés sont présentés dans le **tableau III-3**. Pour le format d'hybridation « sandwich », les concentrations en sonde capture et signal étaient toutes deux de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Pour ce nouveau format, les concentrations optimales sont respectivement de $0,1$ et $0,001 \mu\text{mol.L}^{-1}$, soit 100 fois plus de sonde capture que de signal. Le temps de pré-hybridation a été allongé pour le format compétitif afin de permettre une meilleure fixation entre la sonde signal et la cible et le temps d'hybridation a, quant à lui, été réduit à 15 min pour éviter une dissociation des complexes sonde signal/cible formés. Enfin, la température d'hybridation est de 65°C au lieu de 46°C .

Tableau III-3 : Conditions expérimentales variant entre les formats d'hybridation « sandwich » et compétitif.

Format d'hybridation	Concentration en sonde capture ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Concentration en sonde signal ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Temps de pré-hybridation (min)	Temps d'hybridation (min)	Température d'hybridation ($^\circ\text{C}$)
Sandwich	0,1	0,1	10	30	46
Piégeage	0,1	0,001	20	20	65

Une fois les conditions expérimentales optimisées, des courbes de calibration ont été réalisées avec les PC (**Figure III-15**). Comme cela est attendu, l'absorbance mesurée décroît avec l'augmentation de la concentration en cible. La réponse observée est similaire pour les deux couples de sondes, avec une diminution exponentielle du signal entre 1 et 50 nmol.L^{-1} puis une phase de plateau au cours de laquelle le signal atteint sa valeur minimale. Des limites

de détection de 5 nmol.L⁻¹ et 1 nmol.L⁻¹ sont respectivement obtenues avec les sondes *Vibrio* spp. et celles du clade Splendidus.

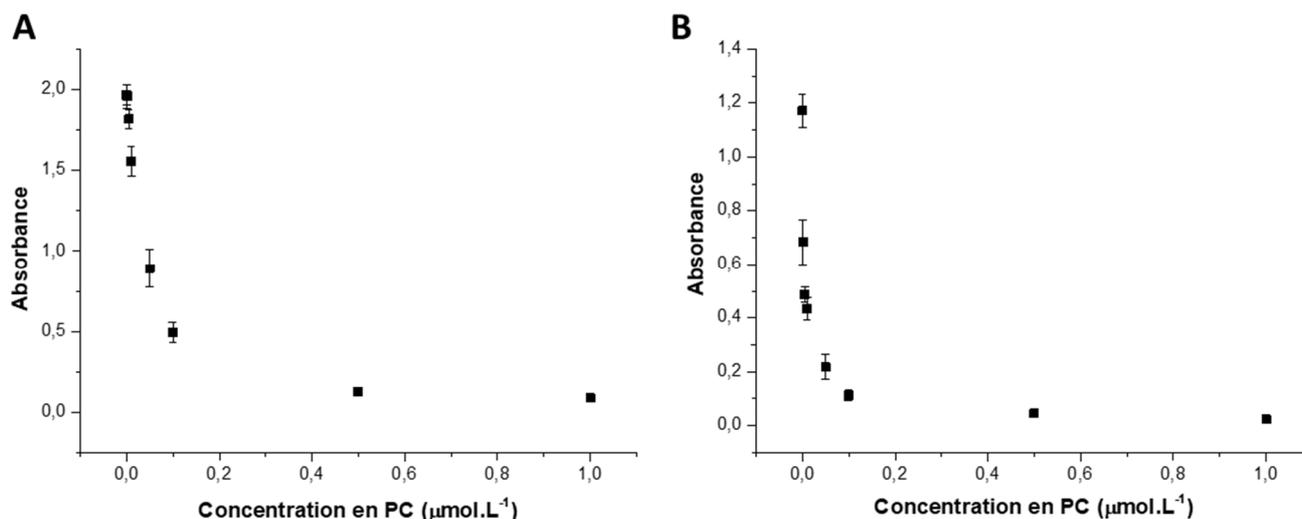


Figure III-15 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) en fonction de la concentration en PC. **(A)** sondes *Vibrio* spp. et **(B)** sondes clade Splendidus (n=3).

III.2.1.2. Validation du système avec des acides nucléiques extraits de suspensions bactériennes pures

L'étape de validation du système avec les PC s'étant avérée concluante en colorimétrie, cette méthode de détection a ensuite été conservée lors de l'étape de validation avec des acides nucléiques extraits de souches de référence. Dans un premier temps, les essais ont été réalisés avec les sondes *Vibrio* spp., dont les résultats sont présentés ci-dessous.

III.2.1.2.1. Détection de l'ARN

Une gamme d'ARN total de *Vibrio* de concentrations comprises entre 0 à 50 ng. L⁻¹ a tout d'abord été réalisée (**Figure III-16**). Cette gamme a été définie en se basant sur les concentrations mesurées sur les extraits d'ARN total provenant des échantillons d'eau collectés dans la lagune de Salses-Leucate (Chapitre I). Aucune différence significative du signal n'a été observée entre les différentes concentrations en ARN testées. Des concentrations en ARN total trop faibles pour le fonctionnement de ce format d'hybridation pourraient expliquer ce phénomène. Ainsi, une seconde gamme allant de 0 à 380 ng. L⁻¹ a été envisagée.

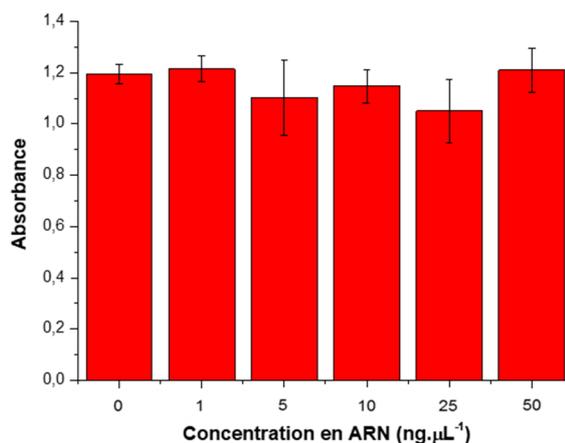


Figure III-16 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ARN total de *Vibrio* comprises entre 0 et 50 ng.µL⁻¹ (n=3).

La figure III-17 met en évidence, dans cette gamme, une relation linéaire entre la concentration en ARN et l'intensité du signal colorimétrique résultant. Cependant, augmenter la concentration en cible réduit significativement la sensibilité du système.

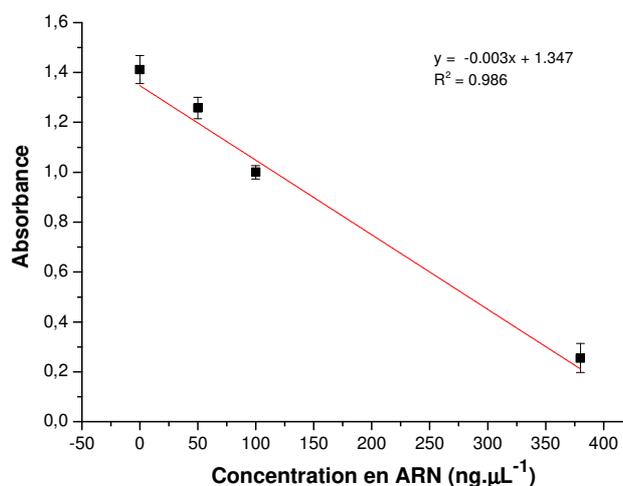


Figure III-17 : (A) Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ARN de *Vibrio* comprises entre 0 et 380 ng.µL⁻¹ (n=3).

Nous avons ensuite vérifié l'impact de la fragmentation de l'ARN cible sur la réponse obtenue. Les molécules d'ARN sont susceptibles d'adopter une conformation particulière sous la forme de structures « tige-boucle » et de se replier sur elle-même, empêchant ainsi l'accès à la séquence d'ARNr 16S ciblée par la sonde signal. Nous supposons ainsi que, comme cela avait été observé pour le format « sandwich », le fait de fragmenter l'ARN cible permettait une meilleure hybridation avec la sonde signal. De manière étonnante, la diminution du signal

la plus significative par rapport à un échantillon sans ARN, est obtenue pour l'ARN non fragmenté avec une diminution du signal de 38% alors qu'elle est seulement de 5% avec une étape de fragmentation (**Figure III-18**). Pour la suite des essais, l'étape de fragmentation de l'ARN a donc été supprimée.

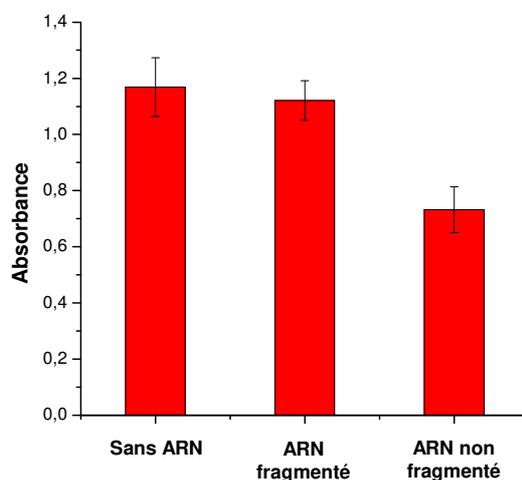


Figure III-18 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des échantillons sans ARN ou avec de l'ARN total de *Vibrio* à $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ fragmenté ou non ($n=3$).

Malgré un manque de sensibilité apparent, nous nous sommes ensuite intéressés à la spécificité du biocapteur. Pour cela, différentes concentrations en ARN total de *Vibrio* et d'*E. coli* ont été utilisées (**Figure III-19**). Tout d'abord, nous notons que les signaux mesurés avec *E. coli* sont systématiquement plus faibles que ceux obtenus pour *Vibrio*. Par ailleurs, alors que la réponse reste stable pour les différentes concentrations en ARN de *Vibrio* testées (CV de 7%), elle varie davantage pour *E. coli* (CV de 16%). Ces observations vont donc à l'encontre de ce qui était attendu.

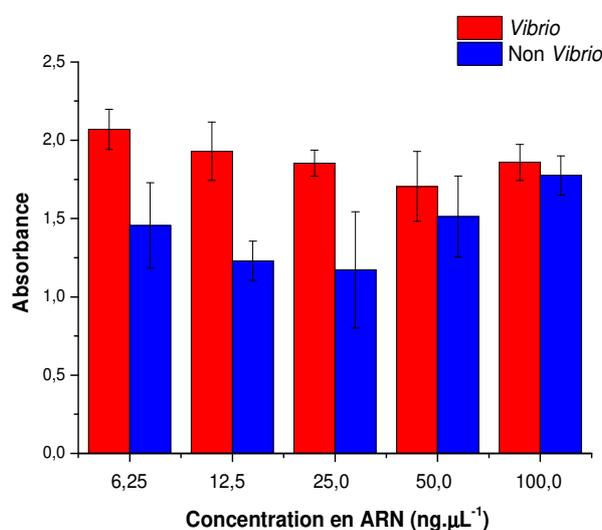


Figure III-19 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ARN total de *Vibrio* (rouge) et non *Vibrio* (bleu) comprises entre $6,25$ et $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ($n=3$).

III.2.1.2.2. Détection de l'ADN

Les résultats obtenus avec l'ARN ne s'étant pas révélés concluants, nous avons ensuite choisi de travailler avec de l'ADN. En effet, dans ce format d'hybridation, les sondes signal peuvent être comparées à des amorces PCR, qui en présence de la cible à haute température, viennent s'hybrider à la séquence cible. Dans cette optique, nous avons dans un premier temps évalué la résistance à la chaleur de la sonde signal, et plus particulièrement du marquage digoxygénine porté à son extrémité 3'. Ainsi, une solution contenant la sonde signal a été soumise à différentes températures pendant 1 min avant d'être mise en présence de la sonde capture. Un témoin a été réalisé sans chauffage préalable de la sonde signal. Les essais ont tout d'abord été réalisés en simplicats. Comme le montrent les résultats obtenus **figure III-20**, une diminution du signal est observée avec la diminution de la température. De plus, pour des températures de 90 et 85°C, une diminution du signal est observée par rapport au témoin sans chauffage. De manière étonnante, le signal mesuré après chauffage à 95°C semble plus élevé que celui obtenu sans chauffage. Ainsi, le chauffage de la sonde signal à haute température (95°C) semble contribuer à son relâchement et, par conséquent, optimiser sa fixation à la sonde capture.

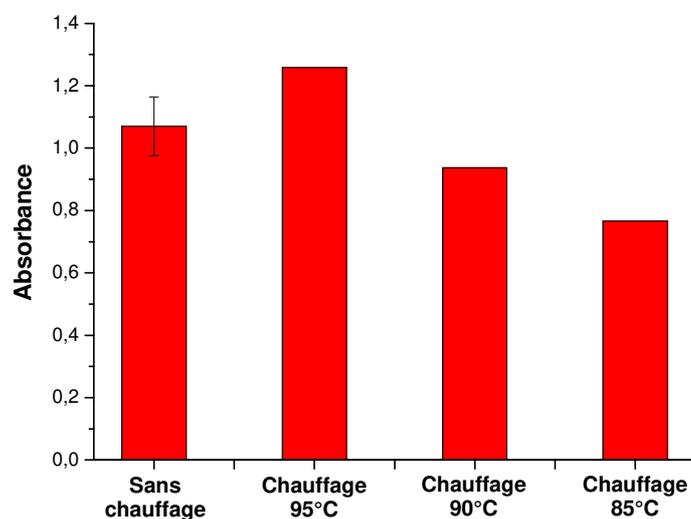


Figure III-20 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des solutions de sonde signal non chauffées ou soumises à différentes conditions de température (n=3 pour la condition « sans chauffage » ; n=1 pour les 3 autres conditions).

En utilisant ces conditions opératoires, nous nous sommes ensuite directement intéressés à la spécificité du système afin de savoir si les résultats étaient similaires à ceux obtenus avec l'ARN. Pour cela, des solutions d'ADN de *Vibrio* et de non *Vibrio* (*E. coli*) à $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ont été testées, correspondant en fait aux extraits d'ADN purs, sans dilution (**Figure III-21**). Par rapport à l'échantillon sans ADN, une diminution du signal de 38 % est observée avec de l'ADN de *Vibrio* alors qu'elle est de 24% en présence d'ADN d'*E. coli*. Ainsi, une diminution du signal est également constatée en présence d'ADN non ciblé. Cela pourrait provenir d'un emprisonnement des sondes signal au sein des molécules d'ADN.

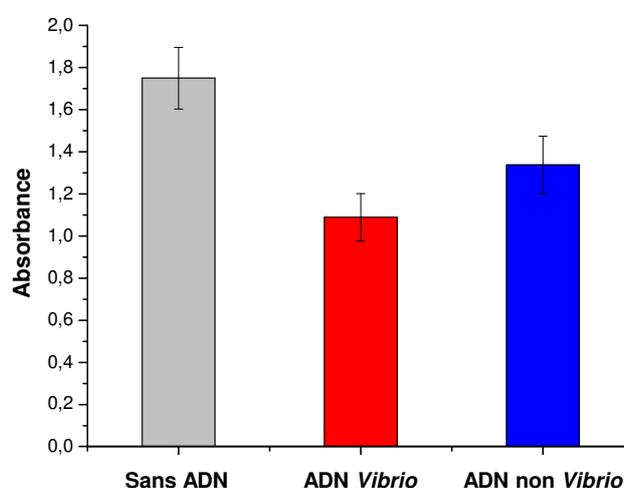


Figure III-21 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630 \text{ nm}$) pour des échantillons sans ADN, ou avec des concentrations en ADN de *Vibrio* ou de non *Vibrio* de $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ($n=3$).

Des essais complémentaires ont ensuite été effectués sur une gamme de concentrations en ADN plus large allant de $0,061$ à $61 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (**Figure III-22**). Tout d'abord, pour des concentrations en ADN comprises entre $0,061$ et $61 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, la diminution du signal par rapport à la condition sans ADN, est significativement plus importante pour *E. coli* que pour *Vibrio*, avec des diminutions respectives de 91-93% et 21-52%. De plus, pour ces concentrations, les réponses mesurées pour *Vibrio* augmentent avec la concentration en ADN testée. Ces observations vont donc à l'encontre des résultats attendus. De manière intéressante, pour une concentration en ADN de $61 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, aucune différence significative n'est observée entre *E. coli* et *Vibrio*, présentant respectivement une diminution du signal de 86,6 % et 87,5%.

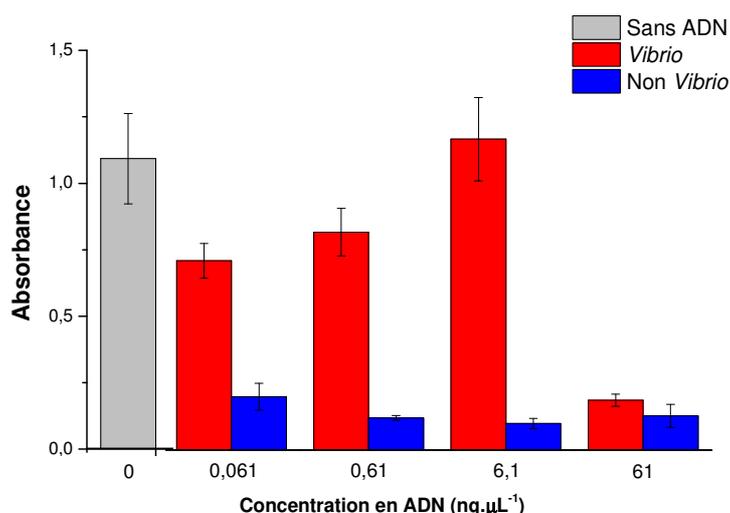


Figure III-22 : Mesure de l'absorbance ($\lambda=630$ nm) pour des concentrations en ADN de *Vibrio* (rouge) et non *Vibrio* (bleu) comprises entre 0,061 et 61 ng.μL⁻¹ (n=3).

Le système d'hybridation compétitif doit encore être optimisé afin de permettre la détection d'acides nucléiques. Il semblerait que le bon fonctionnement de ce format repose sur un équilibre très fin entre les concentrations en sonde capture, sonde signal et en cible, qui reste encore à déterminer. Concernant le travail avec l'ARN, la diminution du signal observée pour *E. coli* laisse supposer que les sondes signal sont capables de s'hybrider avec de l'ARN de non *Vibrio*. Or, il est étonnant de ne pas obtenir les résultats escomptés puisque la spécificité de la sonde signal a déjà été validée en format « sandwich ». Ce phénomène est-il déjà observé en format « sandwich » mais en partie éliminé par la double reconnaissance de la cible ? Concernant les résultats observés pour l'ADN, il se pourrait que les sondes signal soient capturées au sein de la molécule d'ADN engendrant des réponses très variables d'une expérience à une autre. Afin de résoudre ce problème, il pourrait notamment être envisagé de digérer les ADN en utilisant des enzymes de restriction adaptées.

III.2.2. Détection en fluorescence

Le marquage enzymatique possède plusieurs inconvénients, liés notamment à la durée de vie limitée des enzymes et à l'obligation de travailler dans des conditions de pH et de température adaptées. Ainsi, afin de s'affranchir de l'utilisation d'un anticorps couplé à une enzyme et par conséquent de simplifier le protocole, la sonde signal clade *Splendidus* a ensuite été directement marquée à l'extrémité 3' par le fluorophore FAM (fluorescein amidite). Dans un premier temps, afin d'étudier le comportement de la sonde signal, des dilutions décimales de cette sonde ont été réalisées dans du tampon d'hybridation 4X (0,3 M NaCl, 80 mM Tris, 0,04% SDS; pH 8) puis la fluorescence ($\lambda_{\text{absorption}} = 495 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$) a été mesurée directement après dépôt des différentes dilutions dans les puits d'une microplaque noire (Figure III-23).

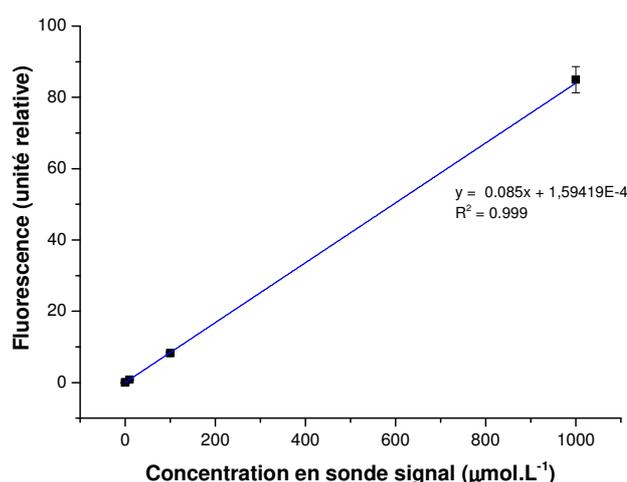


Figure III-23 : Fluorescence mesurée pour différentes concentrations en sonde signal marquée avec la FAM (n=3).

Le signal obtenu est proportionnel à la concentration en sonde signal dans une gamme allant de 0,1 à 1000 nmol.L⁻¹. Les signaux mesurés restent inférieurs à 1 unité de fluorescence entre 0,1 nmol.L⁻¹ et 10 nmol.L⁻¹, seules des concentrations en sonde signal de 100 et 1000 nmol.L⁻¹ ont par la suite été testées avec le protocole expérimental décrit précédemment, c'est-à-dire en présence d'une sonde capture immobilisée de concentration 100 nmol.L⁻¹. Pour les deux concentrations testées, les signaux enregistrés restent inférieurs à 0,1 unité de fluorescence. Or, le format compétitif correspondant à un système « signal OFF », ces signaux devraient être maximum afin d'observer ensuite une diminution de la réponse en présence de la cible. Il est important de noter que les résultats obtenus sont fortement influencés par

la sensibilité de l'appareil de détection de la fluorescence utilisé au laboratoire, à savoir le Fluoro-Luminoskan Ascent™ FL. Cependant, il nous a été impossible d'avoir accès à un autre appareil de mesure plus sensible, limitant l'application de cette stratégie.

III.2.3. Détection en électrochimie

III.2.3.1. Marquage direct de la sonde signal au bleu de méthylène

Comme autre alternative au marquage enzymatique, nous avons marqué directement la sonde signal *Vibrio* spp. à l'aide du MB afin de pouvoir réaliser une détection en électrochimie.

Comme le montre la **figure III-24**, les premiers essais réalisés avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et de sonde signal marquée au MB donnent des signaux se situant dans le bruit de fond. Afin de vérifier que ces observations ne sont pas liées à une élimination des sondes signal capturées lors des lavages, nous avons ensuite essayé de déposer une solution de sonde signal sur l'électrode, sans ajout préalable de sonde capture. Après adsorption complète de la solution à la surface de l'électrode de travail, le signal a été enregistré en DPV et reste toujours dans le bruit de fond (**Figure III-25**).

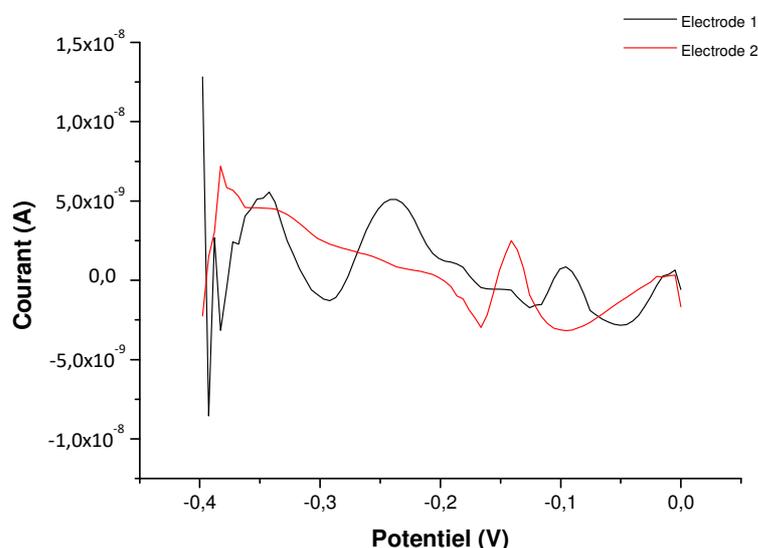


Figure III-24 : Marquage au MB. Voltammogramme en DPV pour $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture immobilisée et de sonde signal. Les mesures sont réalisées dans un tampon phosphate (pH=7) contenant $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl et 5 mmol.L^{-1} de MgCl_2 . Deux électrodes ont été testées.

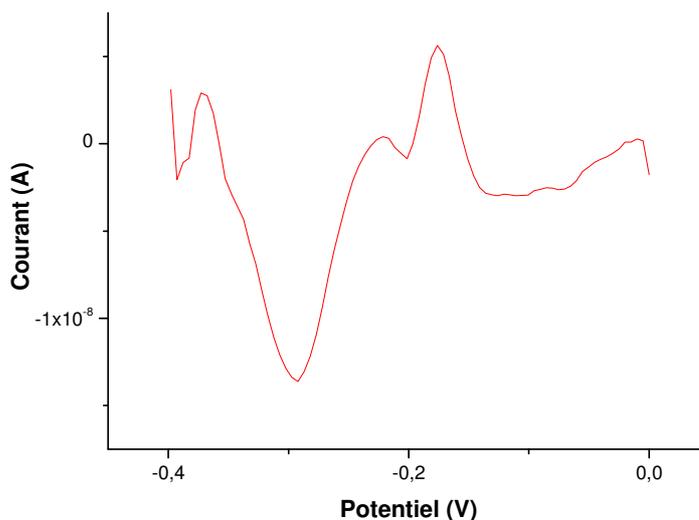


Figure III-25 : Marquage au MB. Voltammogramme en DPV pour $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal adsorbée à la surface de l'électrode de travail. Les mesures sont réalisées dans un tampon phosphate (pH=7) contenant $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl et 5 mmol.L^{-1} de MgCl_2 . Une électrode a été testée.

Afin de savoir si ces résultats peuvent provenir d'une mauvaise synthèse de la sonde signal marquée au MB, des mesures ont été effectuées après adsorption complète, à la surface des électrodes, de solutions de MB à différentes concentrations obtenues par dissolution de MB en poudre dans de l'eau ultra-pure (Figure III-26).

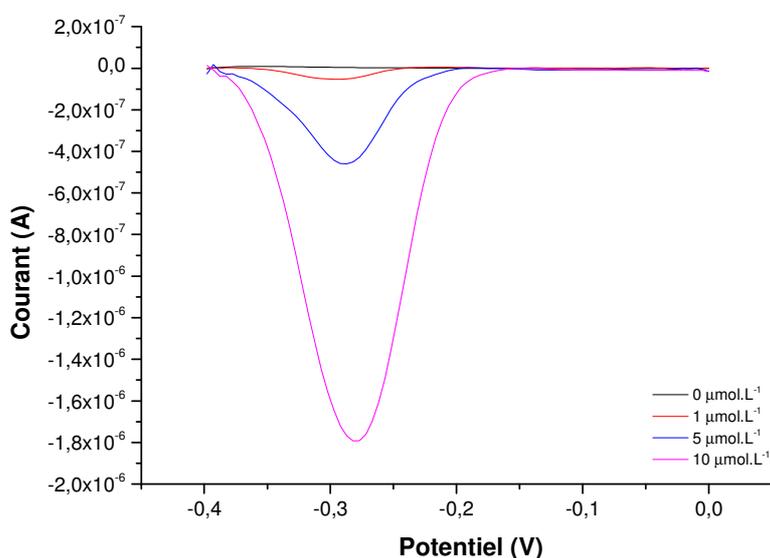


Figure III-26 Voltammogramme en DPV pour différentes concentrations en MB dilué dans de l'eau ultra pure. Les mesures sont réalisées dans un tampon phosphate (pH=7) contenant $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl et 5 mmol.L^{-1} de MgCl_2 . Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

Au vu des résultats obtenus avec le MB seul, il n'est pas étonnant de ne mesurer aucun signal pour une concentration en sonde signal de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. En effet, nous cherchons à avoir des courants maximums aux alentours de 100 nA avec la sonde signal marquée au MB, or avec du MB seul à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ adsorbé à la surface de l'électrode le courant est seulement de 42,5 nA. Une concentration en sonde signal de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ est déjà 1000 fois plus élevée que celle utilisée en colorimétrie, il n'est donc pas envisageable d'augmenter encore cette concentration au risque d'obtenir un système très peu sensible. Dans la configuration du format compétitif, le MB semble être trop éloigné de la surface de l'électrode pour pouvoir permettre un échange d'électrons et par conséquent la génération d'un signal.

Que ce soit en colorimétrie ou en électrochimie, le marquage direct de la sonde signal ne fournit pas de signaux significativement différents du bruit de fond. Ainsi, le système a été marqué grâce à l'utilisation d'un couple anticorps/enzyme comme cela avait été réalisé en colorimétrie.

III.2.3.2. Marquage de la sonde signal avec un couple anticorps/enzyme

III.2.3.2.1. Utilisation de l'enzyme HRP

Dans un premier temps, le système a été testé en utilisant $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sondes capture et signal, sans ajout de PC. Un signal significativement différent du bruit de fond a été obtenu (Figure III-27).

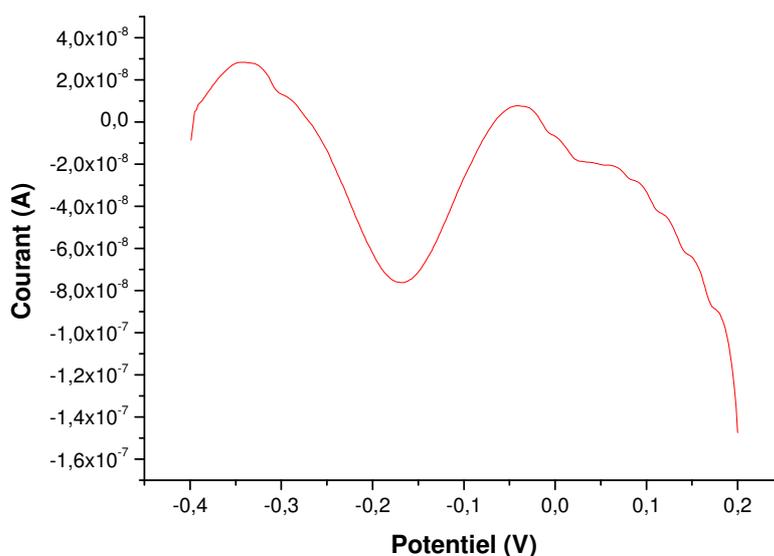


Figure III-27 : Marquage à l'HRP. Voltammogramme en DPV pour $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture immobilisée et de sonde signal. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Une électrode a été testée.

Cependant, lorsque plusieurs concentrations en PC ont été testées, les signaux mesurés étaient totalement aléatoires et non inversement proportionnels à la concentration en PC (Figure III-28).

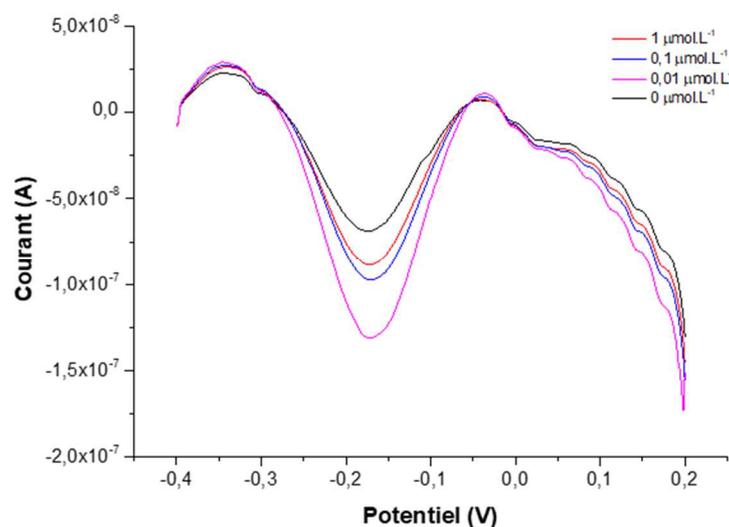


Figure III-28 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sondes capture et signal. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

L'HRP étant connue pour ses inconvénients d'adsorption non spécifique, les résultats obtenus pouvaient être dus à ce phénomène sur la surface de l'électrode. Ainsi, afin de tenter de résoudre ce problème, plusieurs solutions ont été envisagées :

- Tout d'abord, un blocage de la surface de l'électrode avec de l'éthanolamine 1mol.L^{-1} a été réalisé. Un exemple de voltammogramme ainsi obtenu est présenté **figure III-29**. Le signal maximal enregistré correspond au PC à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et non à $0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ comme cela est attendu.

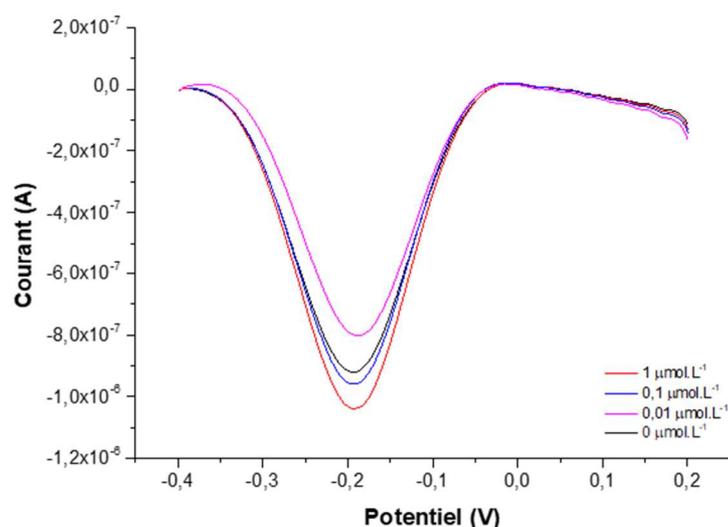


Figure III-29 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et de sonde signal ainsi qu'un blocage à l'éthanolamine. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

- Nous avons ensuite essayé de diminuer la concentration en sonde signal de 1 à $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Figure III-30**). Les signaux générés étant toujours mesurables en utilisant une concentration moins élevée en sonde signal, cette concentration a été conservée pour la suite des essais.

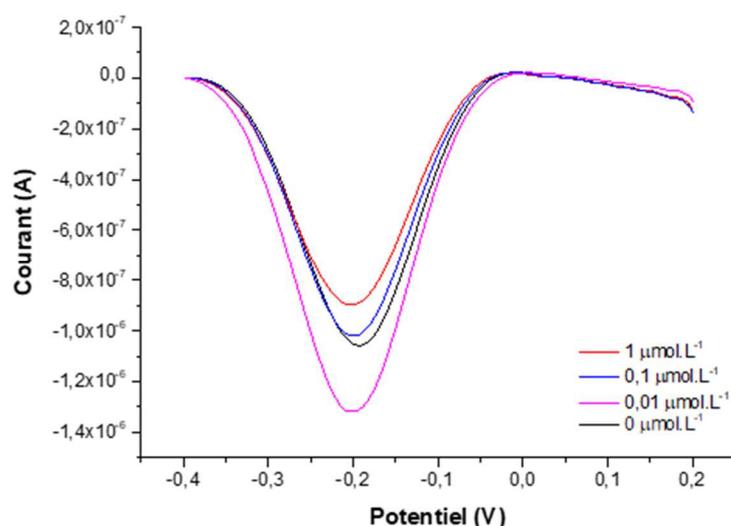


Figure III-30 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal ainsi qu'un blocage à l'éthanolamine. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

- Un blocage à la caséine 1% a ensuite été ajouté en plus du blocage à l'éthanolamine. Les signaux restent aléatoires et non inversement proportionnels à la concentration en PC (**Figure III-31**).

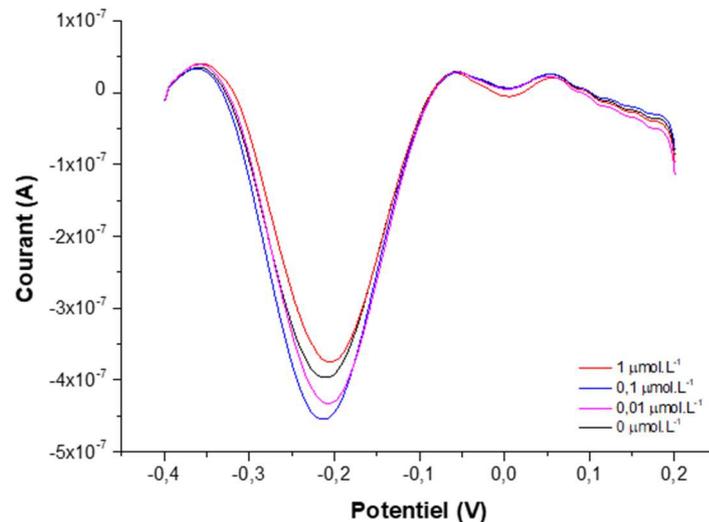


Figure III-31 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal ainsi qu'un double blocage éthanolamine/caséine. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

- Du Tween 20 (0,1%) a été ajouté au tampon de rinçage utilisé après l'étape de fixation du conjugué anticorps/HRP afin de tenter d'éliminer les enzymes qui auraient pu s'adsorber à la surface de l'électrode. Le signal maximal ne correspond toujours pas à une concentration nulle en cible (**Figure III-32**).

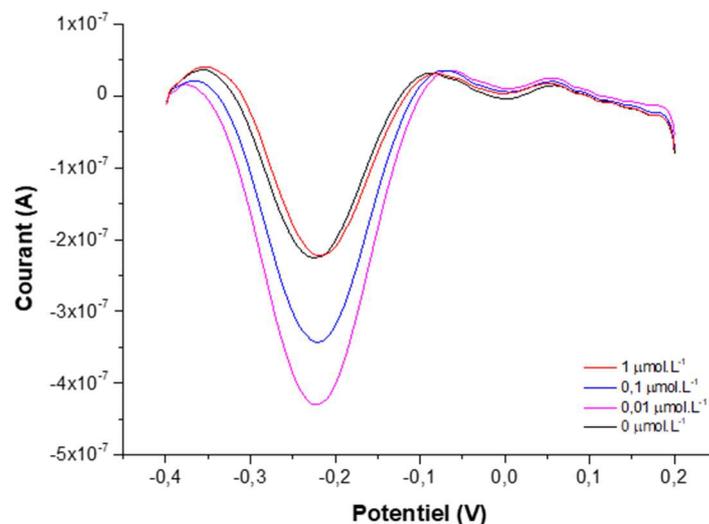


Figure III-32 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal, un double blocage éthanolamine/caséine et la modification du tampon de rinçage. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

- En plus du blocage à la caséine et de l'utilisation d'un tampon de rinçage contenant du Tween, de la BSA (0,025%) a été ajoutée directement dans la solution d'anticorps marqué à l'HRP (Low *et al.*, 2012). Le premier essai réalisé permet d'obtenir un signal mesuré proportionnel à la concentration en PC (**Figure III-33**). Cependant, ces mêmes conditions expérimentales ont été répétées et les résultats différents de ceux illustrés ici.

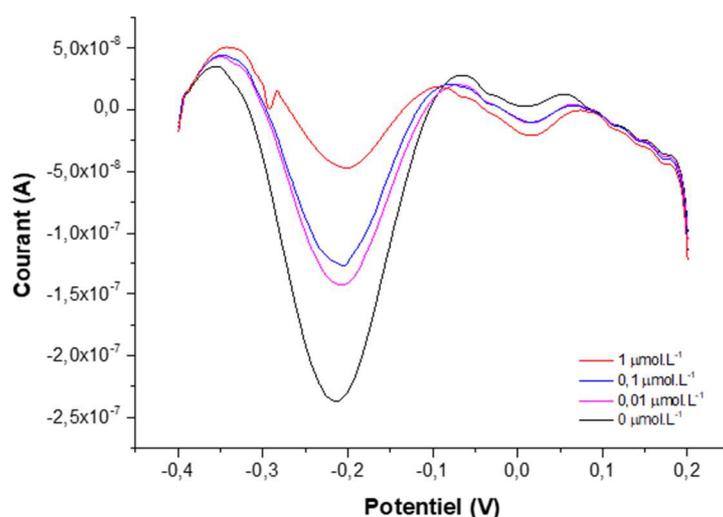


Figure III-33 : Marquage à l'HRP. Exemple de voltammogramme obtenu en DPV pour différentes concentrations en PC, avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde capture et $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sonde signal, un double blocage éthanolamine/caséine, la modification du tampon de rinçage ainsi que l'ajout de BSA dans la solution d'anticorps/HRP. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, une électrode a été testée.

Les problèmes rencontrés pourraient également provenir d'une mauvaise reproductibilité des électrodes notamment liée à l'immobilisation des sondes capture à leur surface. Afin de vérifier cette hypothèse, 3 électrodes ont été réalisées pour chacune des concentrations en PC testées, en conservant l'ensemble des conditions expérimentales précédemment testées, à savoir un double blocage éthanolamine/caséine, la modification du tampon de rinçage ainsi que l'ajout de BSA dans la solution d'anticorps/HRP. Comme l'illustre la **figure III-34**, le signal enregistré pour $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PC est plus élevé que celui obtenu pour $0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et les écarts types mesurés pour chacune des concentrations sont très importants, avec des CV allant de 16 à 32%.

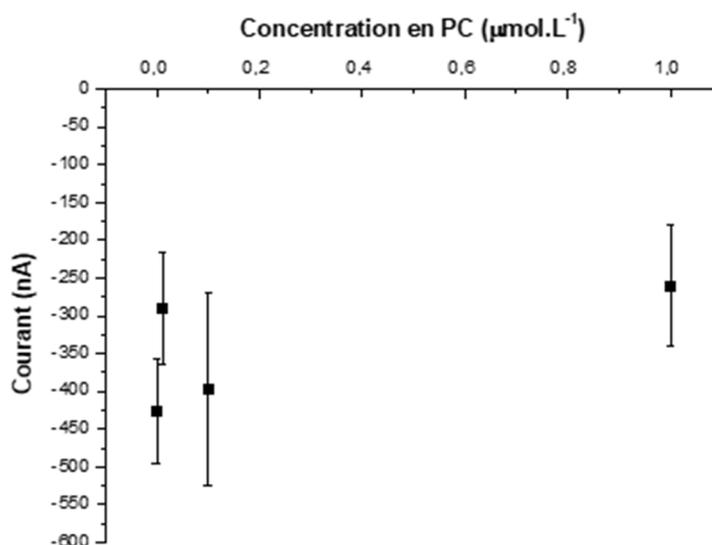


Figure III-34 : Marquage à l'HRP. Courants mesurés en DPV pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une concentration en sonde capture de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et en sonde signal de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les mesures sont réalisées dans une solution d' H_2O_2 (1 mmol.L^{-1}) / hydroquinone (1 mmol.L^{-1}). Pour chacune des concentrations en PC, 3 électrodes ont été testées.

III.2.3.2.2. Utilisation de l'enzyme PAL

L'ensemble des solutions envisagées n'a pas permis d'obtenir les signaux inversement proportionnels à la concentration en cible attendus, ni des résultats reproductibles. Une seconde enzyme, la PAL, présentant moins d'adsorption non spécifique que l'HRP, a donc été testée. Les premiers essais réalisés sur 3 électrodes pour chaque concentration en PC montrent que les signaux obtenus sont bien inversement proportionnels à la concentration en PC et seule la concentration en PC de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ présente un CV supérieur à 5% (**Figure III-35**).

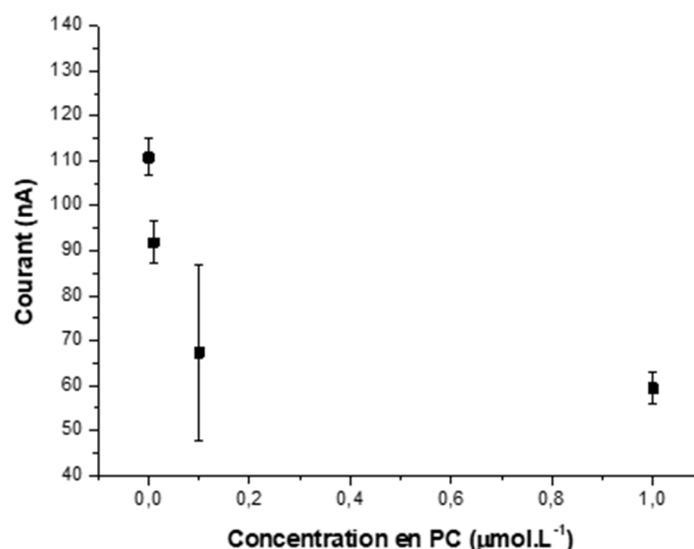


Figure III-35 : Marquage à la PAL. Courants mesurés en DPV pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une concentration en sonde capture de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et en sonde signal de 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Les mesures sont réalisées dans un tampon DEA (0,1 mol.L^{-1}) contenant 20 mmol.L^{-1} de naphthyl phosphate. Pour chacune des concentrations en PC, 3 électrodes ont été testées.

Ces mêmes conditions opératoires ont ensuite été appliquées 5 fois de suite et les résultats obtenus montrent un manque de reproductibilité de la méthode (**Figure III-36**).

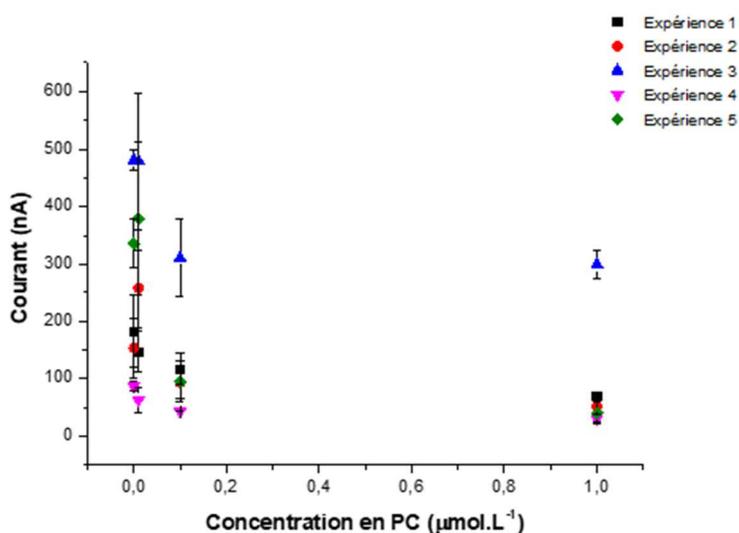


Figure III-36 : Marquage à la PAL. Courants mesurés en DPV pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 µmol.L⁻¹ avec une concentration en sonde capture de 1 µmol.L⁻¹ et en sonde signal de 0,1 µmol.L⁻¹. Les mesures sont réalisées dans un tampon DEA (0,1 mol.L⁻¹) contenant 20 mmol.L⁻¹ de naphthyl phosphate. Pour chacune des concentrations en PC, 3 électrodes ont été testées.

Bien que comparés aux résultats avec l'HRP, une logique soit observée pour les deux concentrations en PC les plus élevées (0,1 et 1 µmol.L⁻¹) qui donnent toujours des signaux inférieurs aux deux autres concentrations, les signaux mesurés restent aléatoires d'une expérience à l'autre. Pour certaines, une concentration nulle en PC correspond bien à une réponse maximale alors que pour d'autres la réponse maximale est enregistrée pour une concentration en PC de 0,01 µmol.L⁻¹. De plus, des CV élevés sont observés pour toutes les concentrations en PC puisqu'ils sont en moyenne de 19 %, 29 %, 18% et 21 %, pour des concentrations en PC de 0, 0,01, 0,1 et 1 µmol.L⁻¹. Les variations d'intensité du signal entre expériences pour une même concentration en PC peuvent être liées à la préparation des lots d'électrodes ainsi qu'à l'utilisation de la solution de substrat devant être fraîchement préparée avant chaque expérience.

En conclusion, l'utilisation de la PAL à la place de l'HRP permet d'obtenir de meilleurs résultats. Cependant, vu le manque de reproductibilité persistant et les résultats hétérogènes obtenus avec les faibles concentrations de PC, il semblerait que le couplage covalent des sondes capture à la surface des électrodes ne soit pas homogène. Afin de vérifier cette hypothèse, d'autres techniques d'immobilisation pourraient être utilisées telles que le

greffage thiol sous forme de monocouche à la surface d'électrodes en or ou la chimie click. Cependant, étant donné le temps imparti, ces méthodes n'ont pas pu être envisagées au cours de la thèse.

IV. Conclusions du chapitre

Le dernier chapitre de ce manuscrit concerne le développement des génocapteurs suivant deux formats d'hybridation. Dans un premier temps, pour la détection du genre *Vibrio*, nous avons envisagé un format d'hybridation « sandwich » basé sur l'intercalation des acides nucléiques cibles entre une sonde capture immobilisée et une sonde signal marquée. L'outil développé, se présentant sous la forme d'un test en microplaques 96 puits, cible spécifiquement l'ARN 16S et ne nécessite aucune étape d'amplification PCR préalable. Une méthode de détection par chimiluminescence a été sélectionnée. Après l'optimisation des conditions expérimentales, la calibration du système a été réalisée avec des PC, permettant d'obtenir un signal proportionnel à la concentration en cible dans une gamme de concentrations allant de 0,1 à 2,5 nmol.L⁻¹ avec une LD de 0,1 nmol.L⁻¹. L'analyse d'ARN provenant de 21 souches de *Vibrio* et de 10 souches de non *Vibrio* a ensuite permis de valider la spécificité du test et de déterminer une LD de 5 ng.μL⁻¹ d'ARN préalablement fragmentés. Enfin, le test a été appliqué avec succès à l'analyse d'échantillons d'eau spikés et de plancton naturellement contaminés permettant de détecter jusqu'à 1000 CFU.L⁻¹. En conclusion, l'outil développé dans cette thèse apparaît comme une méthode prometteuse pour la détection du genre *Vibrio* dans l'environnement.

Un autre format d'hybridation, reposant sur la compétition entre la cible et la sonde capture pour la sonde signal, a ensuite été envisagé pour la détection du genre *Vibrio* et du clade Splendidus. Différentes techniques de marquage de la sonde signal et de transduction ont été considérées. Dans un premier temps, un marquage direct a été testé afin de s'affranchir de l'utilisation d'un anticorps. Cependant, cette stratégie ne s'est pas révélée concluante. En effet, le marquage avec la fluorescéine, n'a pas permis d'obtenir un signal de fluorescence maximal suffisamment conséquent afin d'observer une diminution du signal en présence de la cible. Ces résultats pourraient provenir des limites de détection du lecteur de fluorescence employé, ainsi il serait intéressant d'avoir accès à un autre outil de mesure de la fluorescence plus sensible. De la même manière, le marquage direct réalisé avec

le MB pour une détection en électrochimie n'a pas permis d'obtenir un signal significativement différent du bruit de fond. Dans un second temps, afin de pouvoir obtenir un signal mesurable, un marquage enzymatique semblable à celui utilisé en format « sandwich » a été utilisé. Cela a ainsi permis de réaliser la calibration du système compétitif en colorimétrie, présentant des LDs de 5 nmol.L⁻¹ et 1 nmol.L⁻¹ pour *Vibrio* spp., et le clade Splendidus respectivement. Le système a ensuite été testé avec des acides nucléiques (ADN et ARN) extraits de suspensions bactériennes pures. Cependant, les résultats obtenus ne se sont pas révélés concluants. En effet, le système en l'état semble manquer de sensibilité et ne permet pas d'établir une nette distinction entre les souches de *Vibrio* et de non *Vibrio* testées. En parallèle, afin de pouvoir miniaturiser le système, le transfert vers une détection électrochimique a été envisagé. Nous avons été confrontés à des signaux très aléatoires provenant certainement d'une immobilisation instable des sondes capture à la surface du transducteur. A ce jour, le problème n'ayant pas été résolu, d'autres techniques d'immobilisation telle que le greffage de sondes modifiées avec un groupement thiol à la surface d'électrodes en or pourraient constituer des alternatives. La maîtrise de la quantité de sondes capture immobilisée sur l'électrode apparaît déterminante dans ce format.

Conclusion générale et perspectives

En raison d'une augmentation rapide de population, les zones côtières sont actuellement soumises à une pression anthropique croissante contribuant à la modification des paramètres biotiques et abiotiques des eaux. Ces modifications ont de fortes répercussions sur le fonctionnement des écosystèmes marins côtiers. Des effets ont notamment été observés sur les communautés bactériennes présentes dans ces environnements, pour lesquelles des phénomènes d'émergence ou de ré-émergence d'espèces pathogènes pour l'Homme et les animaux ont été constatés (Sapp *et al.*, 2007 ; Boer *et al.*, 2009).

Parmi les pathogènes émergents, le genre *Vibrio*, ubiquiste des écosystèmes littoraux et estuariens, recense de nombreuses espèces pathogènes de l'Homme et d'organismes marins. Les vibrioses causées par ces microorganismes connaissent actuellement une importante augmentation à travers le monde. Elles constituent non seulement un problème de santé publique mais aussi un réel enjeu socio-économique notamment illustré, à l'échelle européenne et française, par les fortes mortalités d'huîtres creuses *Crassostreae gigas* observées depuis 2008. Un suivi de ces agents dans l'environnement apparaît nécessaire afin de mieux comprendre les facteurs influençant leur émergence et de prévenir les risques d'infections. Pour cela, des méthodes de détection non seulement rapides mais également peu coûteuses et simples à mettre en place sont nécessaires.

De par leur simplicité, leur sensibilité, leur potentiel de miniaturisation et d'analyse en temps réel, les biocapteurs apparaissent comme des méthodes prometteuses pour la détection et le suivi des agents pathogènes. Ces outils trouvent aujourd'hui leur application dans divers domaines tels que le diagnostic clinique, l'analyse agro-alimentaire, la surveillance environnementale ou encore la prévention contre la bioterrorisme (Singh *et al.*, 2014 ; Nayak *et al.*, 2009 ; Yoo et Lee, 2016 ; Bahadır et Sezgintürk, 2015). Parmi les biocapteurs, les génocapteurs offrent différents avantages tels que la stabilité des sondes ADN utilisées en tant que biorécepteurs, la possibilité de détecter les molécules d'ADN et d'ARN afin d'obtenir des informations aussi bien sur les fractions totales et actives des pathogènes, des temps de réponse courts, ainsi qu'une grande versatilité liée à une conception des sondes pouvant être adaptée à de nombreuses cibles.

Dans ce contexte, le principal objectif de mes travaux de recherche consistait à développer des génocapteurs pour le suivi des populations de *Vibrio* dans les environnements aquatiques, en ciblant d'une part le genre *Vibrio* dans son ensemble et d'autre part les espèces

appartenant spécifiquement au clade Splendidus en raison de leur implication dans les mortalités d'huîtres creuses.

Les étapes intervenant dans le développement de génocapteurs sont nombreuses, incluant la préparation des échantillons, le choix des cibles et du format d'hybridation, ainsi que la sélection du biorécepteur et de la méthode de transduction.

Suite à l'ensemble des recherches bibliographiques réalisées, nous avons dans un premier temps choisi de cibler le gène codant pour l'ARNr 16S en raison de son utilisation en taxonomie bactérienne et par conséquent, du nombre important de séquences disponibles dans les bases de données (Schmalenberger *et al.*, 2001 ; Petti *et al.*, 2005). Ce gène présente des régions très conservées et d'autres très variables permettant de distinguer les différents genres et espèces. De plus, sa présence en plusieurs copies dans le génome des procaryotes facilite sa détection. D'autres gènes plus discriminants, tels que *gyrB* codant pour la sous-unité β de l'ADN gyrase ou *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, auraient pu être envisagés en tant que cibles, notamment pour l'étude du clade Splendidus (LeRoux *et al.*, 2004 ; Ki *et al.*, 2009). Cependant, il s'agit de gènes unitaires, rendant leur détection difficile sans étape préliminaire d'amplification par PCR. De plus, pour ces deux gènes, peu de séquences sont actuellement disponibles dans les bases de données représentant ainsi un frein à la conception de sondes.

La culture sur milieu gélosé et la qPCR, couramment employées pour l'étude des *Vibrio* dans l'environnement, ont été choisies comme méthodes de référence afin de détecter et de quantifier les *Vibrio* cultivables et totaux au sein des échantillons réels. Avant de pouvoir être appliqués à l'analyse d'échantillons environnementaux, l'optimisation et l'évaluation des performances des protocoles de qPCR se sont révélées nécessaires. Sur la base des concentrations obtenues à l'aide de ces deux techniques de référence, nous avons déterminé que les *Vibrio* cultivables constituent seulement 4 à 27% des *Vibrio* totaux présents dans l'eau aux périodes de prélèvement. De plus, nos résultats indiquent, toujours sur ces mêmes périodes, que les *Vibrio* totaux représentent au maximum 0,0009% de la communauté bactérienne totale. Ces observations montrent la nécessité de disposer d'outils sensibles et spécifiques, s'affranchissant de toute méthode culturale et permettant une détection des fractions actives. Dans ce but, deux formats d'hybridation ont été envisagés au cours de cette étude.

Dans un premier temps, un système basé sur un format d'hybridation « sandwich », largement utilisé pour l'étude d'autres genres bactériens tels que *Escherichia* et *Salmonella*, a été développé (Liao *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2012 ; Paniel et Baudart, 2013 ; Abdalhai *et al.*, 2015). Les performances analytiques de cet outil ont été confrontées à celles des 3 biocapteurs décrits dans la littérature pour la détection d'acides nucléiques de *Vibrio* sans étape préalable d'amplification par PCR. Le premier biocapteur, utilisant une détection en chimiluminescence, présente une LD de 3,133 ng.µL⁻¹ d'acides nucléiques (Patel *et al.*, 2015) tandis que les 2 autres, basés sur une transduction électrochimique, possèdent respectivement des LD de 35,2 ng.µL⁻¹ et 21,7 ng.µL⁻¹ d'acides nucléiques (Patel *et al.*, 2013 a et b). Ainsi, comparés à ces 3 outils, notre système permettant de détecter jusqu'à 5 ng.µL⁻¹ d'ARN total, présente une LD tout à fait satisfaisante. De plus, notre outil présente l'avantage d'être applicable à l'analyse directe d'échantillons environnementaux, sans étape de pré-enrichissement ou de dopage des échantillons. Cependant, le format d'hybridation « sandwich » nécessite de nombreuses étapes, rendant son transfert vers un système en microfluidique limité.

Ainsi, un second format d'hybridation dérivé du principe utilisé pour le développement d'un système d'immunodétection en flux (AWACSS) (Tschmelak *et al.*, 2005) a ensuite été évalué. A notre connaissance, aucun système de ce type n'a précédemment été décrit pour la détection de séquences nucléiques. Dans l'optique d'une adaptation à l'analyse de terrain, différentes méthodes de transduction et de marquage de la sonde signal ont alors été considérées. La calibration du format compétitif a été réalisée en colorimétrie, puis le système a ensuite été éprouvé avec des acides nucléiques (ADN et ARN) extraits de suspensions bactériennes pures. Cependant, les résultats obtenus ne se sont pas révélés concluants. En effet, le système en l'état semble manquer de sensibilité et ne permet pas d'établir une distinction entre les souches de *Vibrio* et de non *Vibrio* testées. En parallèle, afin de faciliter la miniaturisation et par conséquent une utilisation sur le terrain, la calibration du système a été envisagée en électrochimie. Nous avons été confrontés à des signaux très aléatoires, que nous n'avons pas observés en colorimétrie. En dehors de la méthode de transduction, la seule différence repose sur la technique employée pour l'immobilisation de la sonde capture à la surface du support, à savoir par affinité neutravidine/biotine en colorimétrie et par couplage covalent en électrochimie. Ces observations semblent ainsi liées à une immobilisation instable des sondes capture à la surface des électrodes. Enfin, dans le but de s'affranchir d'une étape

supplémentaire, un marquage direct de la sonde signal a été évalué aussi bien en détection fluorescente qu'en électrochimie. Dans les deux cas, aucun signal significativement différent du bruit de fond n'a pu être mesuré. En conclusion, le développement de ce système met en évidence plusieurs verrous :

- la méthode d'immobilisation utilisée en électrochimie ne semble pas permettre un greffage reproductible des sondes capture à la surface du transducteur, entraînant d'importantes variations du signal entre répliqués. Afin de pouvoir réaliser la calibration du système en électrochimie, la première étape consisterait donc à évaluer d'autres méthodes d'immobilisation. Le couplage de sondes capture modifiées avec un groupement thiol pourrait être envisagé afin de permettre l'immobilisation directe à la surface d'électrodes en or. Cette technique rapide et simple à mettre en œuvre a largement été décrite dans la littérature pour l'immobilisation de sondes ADN sur des surfaces en or (Wang *et al.*, 2004 ; Yang et Zhang, 2010 ; Hao *et al.*, 2011 ; Das *et al.*, 2014). Quelle que soit la méthode retenue, il apparaît essentiel de contrôler la quantité de sondes immobilisées, afin d'obtenir un signal maximum identique entre chaque électrode et ainsi mesurer les variations de signal les plus faibles.

- dans un second temps, il apparaît important d'optimiser le système afin de détecter des acides nucléiques extraits de suspensions bactériennes pures et d'échantillons environnementaux. Les résultats obtenus avec les acides nucléiques montrent que la diminution du signal enregistrée n'est pas proportionnelle à la concentration en cible dans l'échantillon. De plus, la distinction *Vibrio*/non *Vibrio* n'a pas pu être réalisée. Il semblerait donc que la fixation de la sonde signal à la cible ne soit pas optimale. Il serait possible d'augmenter la taille de la sonde signal afin d'obtenir, comme dans le cas du format d'hybridation « sandwich », une hybridation sur 70 pb. Cela permettrait non seulement d'augmenter la stabilité de l'hybridation mais également d'améliorer la spécificité du système.

Au cours de cette étude, la difficulté à travailler avec l'ADN a également été mise en évidence. En effet, cette molécule double brins doit tout d'abord être dénaturée afin de permettre l'accès des sondes à la séquence cible. De plus, son haut poids moléculaire conduit

dans la plupart des cas à un encombrement stérique limitant l'hybridation cible/sonde immobilisée. Afin de remédier à ce problème, une sonication des ADNg peut être réalisée avant l'étape de dénaturation comme cela a été décrit pour le genre *Vibrio* ou d'autres cibles bactériennes telle que *E. coli* (Mann et Krull, 2004 ; Arora *et al.*, 2007 ; Patel *et al.*, 2013 a et b ; Patel *et al.*, 2015). Dans le but de s'affranchir de ces étapes de pré-traitement, de nombreux génocapteurs sont aujourd'hui basés sur la détection d'amplicons (Das *et al.*, 2015 ; Loaiza *et al.*, 2009). L'amplification par PCR constitue un avantage pour la détection de cibles présentes à faible concentration. Néanmoins, des biais de PCR sont couramment rencontrés lors de l'analyse d'échantillons environnementaux, du fait de la présence d'inhibiteurs.

Dans le but de détecter la fraction active des *Vibrio*, les ARNs ont également été ciblés. Notre choix s'est porté sur l'ARNr 16S, qui de par sa structure *a priori* simple brin et sa présence en multicopies dans le génome, a déjà été employé pour la détection de bactéries telles que *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. et *Klebsiella* spp. (Gau *et al.*, 2001 ; Liao *et al.*, 2006 ; Liao *et al.*, 2007).

Tout au long de la thèse, les résultats obtenus nous ont amené à une réflexion sur les méthodes de préparation et de pré-traitement des acides nucléiques avant leur analyse. Dans le cas des bactéries, l'ADN est généralement extrait par simple lyse thermique et/ou chimique des cellules ou *via* l'utilisation de kits commerciaux dédiés à cet usage (Xia *et al.*, 2008 ; Bifulco *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2015 ; Garrido *et al.*, 2015 ; Izadi *et al.*, 2016 ; Nordin *et al.*, 2017). Les analyses quantitative et qualitative des extraits sont ensuite réalisées par méthodes spectrophotométriques qui, comme nous l'avons montré, n'établissent pas de distinction entre ADN et ARN. De plus, les études utilisant exclusivement une lyse cellulaire ne mentionnent aucune étape de traitement à la RNase pour l'élimination avant analyse des ARN co-extraits. Lorsqu'une étape d'amplification par PCR précède l'analyse en génocapteur, cela ne pose pas de problème, mais lorsque les lysats sont testés directement, la reconnaissance de l'ARN par les sondes immobilisées peut biaiser les résultats obtenus. Il est également important de noter que dans de nombreux travaux les performances des génocapteurs développés sont uniquement évaluées à partir d'ADN complémentaires synthétiques simples brins et non d'acides nucléiques extraits de souches bactériennes (Das *et al.*, 2014 ; Solanki *et al.*, 2009 ; Liao *et al.*, 2009 ; Martínez-Paredes *et al.*, 2010 ; García *et al.*, 2012 ; Tabrizi et Shamsipur, 2015).

L'optimisation de plusieurs paramètres devra être réalisée avant de transférer le système vers une méthode d'analyse en microfluidique. Ce travail nécessitera une collaboration avec des laboratoires extérieurs spécialisés dans le domaine tel que l'Institut d'Electronique et des Systèmes (IES UMR-CNRS 5214) de Montpellier, avec lequel nous sommes en contact.

Il apparaît important de noter que les outils présentés ici sont tout à fait transposables à l'étude de microorganismes d'intérêt, autres que les *Vibrio*, pour le contrôle de la qualité de l'eau ou dans d'autres domaines tels que le diagnostic clinique ou l'agro-alimentaire. Le seul pré-requis étant la disponibilité de séquences dans les bases de données pour le design des sondes ciblant l'organisme d'intérêt.

Ces outils miniaturisés pourraient, à plus long terme, être intégrés au sein de plateformes de détection autonomes afin de réaliser une surveillance *in situ* et en temps réel des pathogènes dans l'eau et ainsi de prévenir les risques de contaminations. En effet, le domaine de l'observation en milieu marin profite actuellement des progrès réalisés dans le développement de plateformes autonomes permettant l'acquisition rapide et en temps réel de données biologiques et environnementales. Cependant, à ce jour, deux plateformes, dont une seule basée sur l'utilisation de sondes ADN, ont été développées pour la détection de microorganismes dans l'eau (Paul *et al.*, 2007 ; Scholin *et al.*, 2009). L'Environmental Sample Processor (ESP) a été mis au point par l'institut de recherche de l'aquarium de Monterey (MBARI) et permet aujourd'hui la détection de plusieurs cibles marines telles que les bactéries hétérotrophes et photosynthétiques, les archées ou les microalgues toxiques (Scholin *et al.*, 2009). Cet outil réalise la collecte des échantillons, la concentration des microorganismes, l'extraction des acides nucléiques ainsi que l'hybridation entre des sondes ADN immobilisées et les ARNs cibles révélée par détection chimiluminescente. L'Autonomous Microbial Genosensor (AMG) développé par l'université South Florida's College of Marine Science pour la détection du dinoflagellé *Karenia brevis*, constitue la première plateforme microbiologique utilisant une amplification des cibles ARN par NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) (Fries *et al.*, 2007). L'amplification est suivie au cours du temps grâce à l'emploi d'un marqueur fluorescent.

Les progrès réalisés dans le domaine de l'acquisition des données permettront certainement d'augmenter le nombre de ce type d'outils dans les années à venir.

Valorisation des travaux de thèse

PUBLICATIONS

- Da-Silva, E., Barthelmebs, L., Baudart, J., 2017. Development of a PCR-free DNA-based assay for the specific detection of *Vibrio* species in environmental samples by targeting the 16S rRNA. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 5690–5700. doi:10.1007/s11356-016-8193-9.

COMMUNICATIONS ORALES

- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. Monitoring des populations de *Vibrio* impliquées dans les mortalités des huîtres creuses en lagune méditerranéenne. Journée des doctorants de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer. 30 Avril 2015, Banyuls-sur-mer, France.
- Da-Silva E., Paniel N., Baudart J., Barthelmebs L. Looking for alternative methods for bacteria monitoring in aquatic environment. 4th international conference on Environmental, Industrial and applied Microbiology. 28-30 Octobre 2015, Barcelone, Espagne.
- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. Looking for alternative methods for *Vibrio* monitoring in aquatic environments. Journée des doctorants de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-mer. 4 Mai 2016, Banyuls-sur-mer, France.
- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. Development of DNA-based biosensors as alternative methods for bacteria monitoring in aquatic environments. 21st Transfrontier Meeting on Sensors and Biosensors. 29-30 Septembre 2016, Barcelone, Espagne.

COMMUNICATIONS PAR POSTER

- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. Development of molecular-based sensors for marine environment analysis. 20th Transfrontier Meeting - Sensors and Biosensors. 1-2 Octobre 2015, Perpignan, France.
- Da-Silva E., Paniel N., Baudart J., Barthelmebs L. DNA-based biosensors as alternative tools for bacteria monitoring in aquatic environments. ISME - 16th International Symposium on Microbial Ecology. 21-26 Août 2016, Montréal, Canada.
- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. A la recherche de méthodes alternatives pour la détection des bactéries du genre *Vibrio* en lagune méditerranéenne. 5^{ème} édition du congrès pluridisciplinaire des doctorants de l'Université de Perpignan Via Domitia. 18-19 Novembre 2016, Perpignan, France.

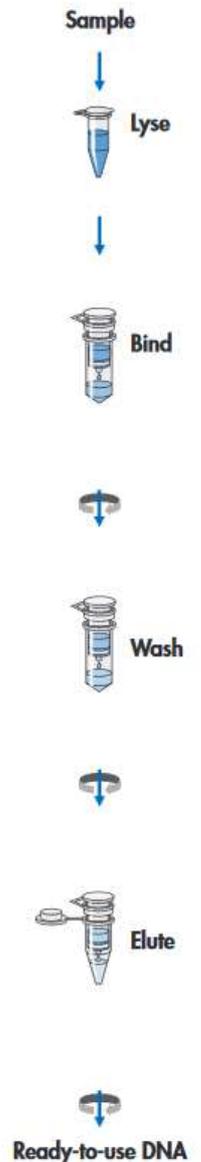
- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. Development of a novel DNA-based biosensor for bacteria detection in environmental samples. 5th International Conference on Bio-Sensing Technology. 7-10 Mai 2017, Riva del Garda, Italie.
- Da-Silva E., Baudart J., Barthelmebs L. A novel nucleic-acid based biosensor for *Vibrio* spp. detection in aquatic environments. 7th Congress of European Microbiologists. 9-13 Juillet 2017, Valencia, Espagne.

Annexes

Annexe I – Protocole d'extraction de l'ADNg avec le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)

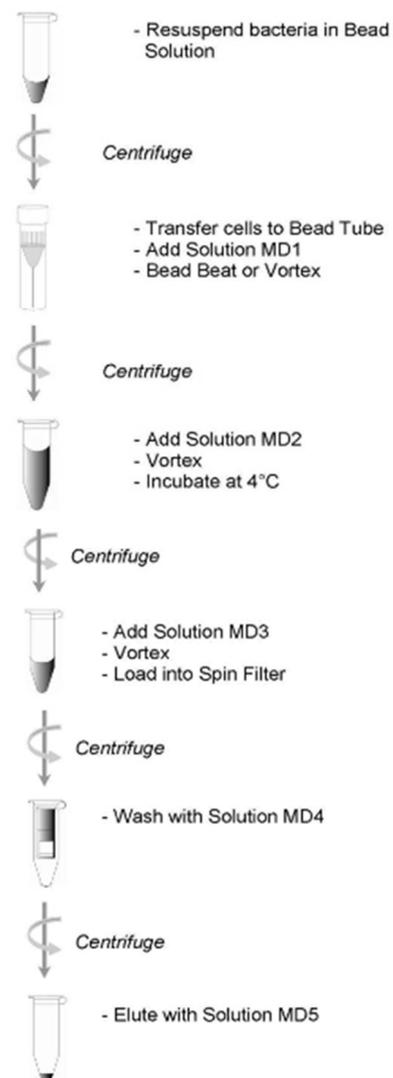
Protocole pour les bactéries GRAM négatif :

- Centrifuger 1,5 mL de culture à 5000 x g pendant 10 min puis éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 180 µL de **tampon ATL**.
- Ajouter 20 µL de **protéinase K** et 2 µL de **SDS** puis vortexer vigoureusement avant d'incuber la solution à 56°C pendant 30 min.
- Après incubation, vortexer la solution pendant 15 s puis ajouter 200 µL de **tampon AL**. Vortexer vigoureusement et ajouter 200 µL d'**éthanol absolu**. Vortexer vigoureusement. Un précipité blanc se forme.
- Transférer la solution dans une colonne DNeasy Mini préalablement placée dans un tube de 2 mL fourni avec le kit. Centrifuger à 6000 x g pendant 1 min.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL puis ajouter 500 µL de **tampon AW1**. Centrifuger à 6000 x g pendant 1 min.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL puis ajouter 500 µL de **tampon AW2**. Centrifuger à 20000 x g pendant 3 min afin de sécher la membrane.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL puis ajouter 50 µL de **tampon AE** directement sur la membrane. Incuber 1 min à température ambiante centrifuger à 6000 x g pendant 1 min.



Annexe II – Protocole d'extraction de l'ADNg à partir du kit PowerLyzer® UltraClean® Microbial DNA Isolation (MoBio)

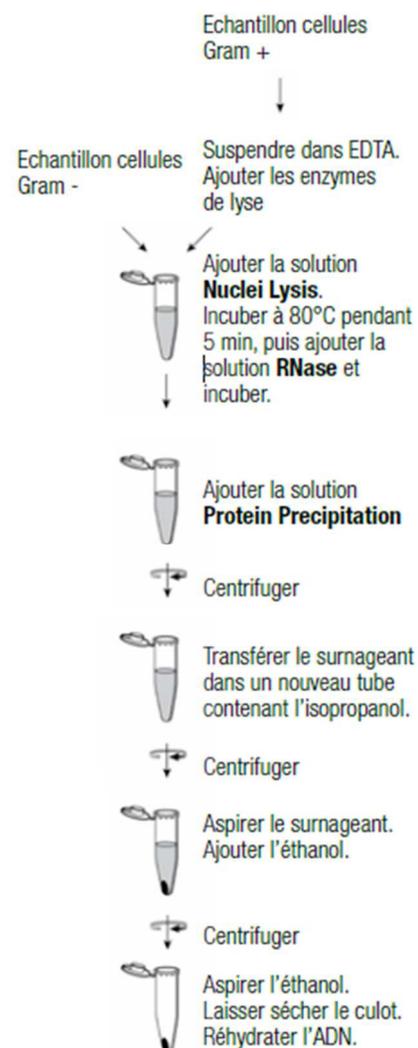
- Centrifuger 1,5 mL de culture à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer le maximum de surnageant et centrifuger à nouveau à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer complètement le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µL de solution **MicroBead** et vortexer doucement. Transférer la suspension dans un tube **PowerLyzer® Glass MicroBead** fourni avec le kit.
- Ajouter 50 µL de solution **MD1** et vortexer brièvement afin de mélanger la suspension avec les billes contenues dans le tube **PowerLyzer® Glass MicroBead**.
- Placer les tubes horizontalement sur l'adaptateur pour vortex MO BIO (MO BIO Vortex Adapter tube holder). Vortexer à puissance maximum pendant 10 min. Centrifuger 30 s à 10 000 x g.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 2 mL fourni avec le kit. **Notes** : la présence de quelques billes dans le surnageant est normale. 300 à 350 µL de surnageant sont attendus.
- Ajouter 100 µL de solution **MD2** au surnageant. Vortexer 5 s et incuber 5 min à 4°C. Centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 2 mL en prenant soin d'éviter le culot formé. **Note** : environ 450 µL de surnageant sont attendus. Ajouter 900 µL de solution **MD3** et vortexer pendant 5 s.
- Charger environ 700 µL sur une colonne **Spin Filter** fournie avec le kit et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer le liquide récupéré dans le tube, charger le reste du surnageant sur la colonne et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s.
- Ajouter 300 µL de solution **MD4** et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s.
- Eliminer le liquide récupéré dans le tube et centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min.
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL en prenant soin de ne pas toucher le liquide avec la colonne.
- Ajouter 50 µL de solution **MD5** au centre de la membrane et centrifuger à 10 000 x g pendant 30s.



Annexe III – Protocole d'extraction de l'ADNg à partir du kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)

Protocole pour les bactéries GRAM négatif :

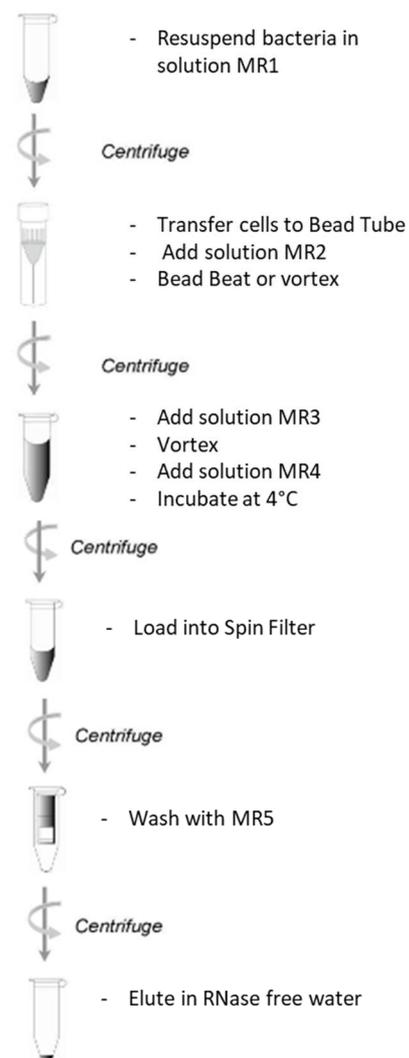
- Centrifuger 1,5 mL de culture à 13000-16000 x g pendant 2 min puis éliminer le surnageant.
- Ajouter 600 µL de solution **Nuclei Lysis**. Pipeter pour mélanger.
- Incuber à 80°C pendant 5 min puis refroidir à température ambiante.
- Ajouter 3 µL de solution **RNase**. Mélanger, incuber à 37°C pendant 15 à 60 min, puis refroidir à température ambiante.
- Ajouter 200 µL de solution **Protein Precipitation**. Vortexer.
- Incuber dans la glace pendant 5 min.
- Transférer le surnageant dans un tube propre contenant 600 µL d'**isopropanol**. Mélanger par inversion jusqu'à apparition des filaments d'ADN
- Centrifuger à 13000-16000 x g pendant 2 min. Eliminer le surnageant.
- Ajouter 600 µL d'**éthanol 70%**. Mélanger.
- Centrifuger à 13000-16000 x g pendant 2 min.
- Aspirer l'éthanol au maximum et faire sécher le culot (tube ouvert) jusqu'à évaporation complète de l'éthanol restant (10-15min).
- Réhydrater l'ADN dans 100 µL de solution DNA Rehydration pendant 1h à 65°C ou toute la nuit à 4°C.



Annexe IV – Protocole d'extraction de l'ARN à partir du kit UltraClean® Microbial RNA Isolation (MoBio)

La solution MR1 ayant tendance à précipiter, il est recommandé de l'incuber 5 min à 65°C avant de l'utiliser. Vérifier également la solution MR2. Si nécessaire, l'incuber également 5 min à 65°C.

- Centrifuger 1,5 mL de culture à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer le maximum de surnageant et centrifuger à nouveau à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer complètement le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 300 µL de solution **MR1** et vortexer doucement. Transférer la suspension dans un tube **MicroRNA Bead** fourni avec le kit.
- Ajouter 15 µL de solution **MR2** et vortexer brièvement afin de mélanger la suspension avec les billes contenues dans le tube **MicroRNA Bead**. Incuber 10 min à 65°C.
- Placer les tubes horizontalement sur l'adaptateur pour vortex MO BIO (MO BIO Vortex Adapter tube holder). Vortexer à puissance maximum pendant 10 min. Centrifuger 30 s à 10 000 x g.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 2 mL fourni avec le kit. **Notes** : la présence de quelques billes dans le surnageant est normale. 300 à 350 µL de surnageant sont attendus.
- Ajouter 500 µL de solution **MR3** au surnageant. Vortexer 5 s et ajouter 250 µL de solution **MR4** avant d'incuber 5 min à 4°C. Centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 2 mL en prenant soin d'éviter le culot formé. **Note** : environ 1000 µL de surnageant sont attendus.
- Charger 650 µL sur une colonne **Spin Filter** fournie avec le kit et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer le liquide récupéré dans le tube, charger le reste du surnageant sur la colonne et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s.
- Ajouter 300 µL de solution **MR5** et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s. Eliminer le liquide récupéré dans le tube et centrifuger à 10 000 x g pendant 1 min. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL en prenant soin de ne pas toucher le liquide avec la colonne.
- Ajouter 50 µL d'eau **RNase free** au centre de la membrane et centrifuger à 10 000 x g pendant 30 s.



Annexe V – Protocole d'utilisation du Bioanalyseur Agilent 2100 (kit RNA 6000 Nano)

Préparation de la seringue :

Ouvrir le support sur lequel est fixée la seringue et vérifier que le cran présent face interne du support soit sur C. Vérifier que le clip en haut de la seringue soit en position la plus haute.



Préparation des échantillons :

Pour une détermination précise de la quantité d'ARN, la concentration en ARN dans l'échantillon testé doit être comprise entre **25** et **500** ng/μL. Diluer les échantillons à analyser dans de l'eau exempte de RNase afin d'être dans cette gamme.



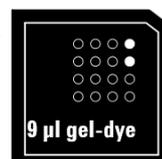
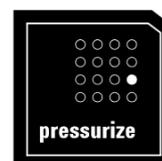
Préparation du gel :

- **Avant utilisation, laisser les réactifs 30 min à température ambiante.**
- Placer 550 μL de gel **RNA 6000 Nano Matrix** (rouge) sur la colonne fournie avec le kit et centrifuger à 1500 x g pendant 10 min. Faire des aliquots de 65 μL de gel filtré à stocker à 4°C et à utiliser dans le mois.
- Vortexer le fluorophore **RNA 6000 Nano dye** (bleu) pendant 10 s puis ajouter 1 μL du fluorophore à 65 μL de gel filtré. Vortexer puis centrifuger à 13000 x g pendant 10 min. Utiliser le gel ainsi préparé dans la journée.



Dépôt du gel :

- Laisser le gel 30 min à température ambiante avant de l'utiliser.
- Ouvrir le support sur lequel est fixée la seringue et placer une nouvelle puce dans l'emplacement prévu.
- Déposer 9 μL de gel dans le puits noté **G**.
- Vérifier que le piston de la seringue soit au niveau de 1 mL et refermer le support.
- Presser le piston jusqu'à ce qu'il soit retenu par le clip.
- Attendre pendant exactement 30 s puis relâcher le clip pour que le piston remonte.
- Attendre 5 s et lentement remonter le piston en position 1 mL.
- Ouvrir le support et déposer 9 μL de gel dans les 2 puits **G**.

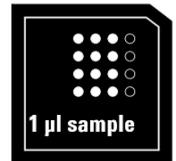
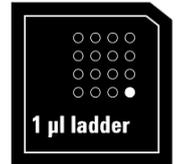


Dépôt du marqueur :

- Déposer 5 μL de marqueur **RNA 6000 Nano marker** (vert) dans les 12 puits échantillons et dans le puits échelle noté .

**Dépôt de l'échelle et des échantillons :**

- Déposer 1 μL d'échelle **RNA 6000 ladder** (jaune) dans le puits échelle. Avant utilisation l'échelle doit être dénaturée 2 min à 70°C.
- Dans les 12 puits de dépôt des échantillons, placer 1 μL d'échantillon ou 1 μL d'eau déionisée (pour les puits non utilisés). **Tous les puits doivent être remplis.**
- Placer la puce sur l'adaptateur et vortexer (vortex IKA) pendant 1 min à 2400 rpm.
- Placer la puce dans le lecteur Agilent 2100 bioanalyzer, lancer l'analyse dans les **5 min.**

**Nettoyage des électrodes après utilisation :**

- Retirer la puce utilisée du lecteur.
- Déposer 350 μL RNase zap dans la puce de lavage, placer la puce 1 min dans le lecteur.
- Déposer 350 μL eau exempte de RNase dans la puce de lavage, placer la puce 10 s dans le lecteur.
- Laisser l'appareil ouvert 10 s pour sécher les électrodes.



Bibliographie générale

- Abdulai M.H., Fernandes A.M., Xia X., Musa A., Ji J., Sun X. (2015) Electrochemical Genosensor To Detect Pathogenic Bacteria (*Escherichia coli* O157:H7) As Applied in Real Food Samples (Fresh Beef) To Improve Food Safety and Quality Control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:5017–5025.
- AFNOR, Association Française de Normalisation (2006) Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) – Norme XP T90-471. La Plaine Saint Denis, France.
- Ahmed A., Rushworth J.V., Hirst N.A., Millner P.A. (2014) Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews* **27**:631–646.
- Allam B., Paillard C., Ford S.E. (2002) Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of aquatic organisms* **48**:221–231.
- Altekruse S.F., Bishop R.D., Baldy L.M., Thompson S.G., Wilson S.A., Ray B.J., Griffin P.M. (2000) *Vibrio* gastroenteritis in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. *Epidemiology & Infection* **124**:489–495.
- Alvarez M., Lechuga L.M. (2010) Microcantilever-based platforms as biosensing tools. *The Analyst* **135**: 827–836.
- Amel B.K.N., Amine B., Amina B. (2008) Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiological Research* **163**:323–328.
- Ansaruzzaman M., Chowdhury A., Bhuiyan N.A., Sultana M., Safa A., Lucas M., von Seidlein L., Barreto A., Chaignat C.-L., Sack D.A., Clemens J.D., Nair G.B., Choi S.Y., Jeon Y.S., Lee J.H., Lee H.R., Chun J., Kim D.W. (2008) Characteristics of a pandemic clone of O3 : K6 and O4 : K68 *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Beira, Mozambique. *Journal of Medical Microbiology* **57**:1502–1507.
- Arora K., Prabhakar N., Chand S., Malhotra B.D. (2007) *Escherichia coli* Genosensor Based on Polyaniline. *Analytical Chemistry* **79**:6152–6158.
- Asplund M.E., Baden S.P., Russ S., Ellis R.P., Gong N., Hernroth B.E. (2014) Ocean acidification and host-pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. *Environmental Microbiology* **16**:1029–1039.
- Austin B. (2010) *Vibriosis* as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* **140**:310–317.
- Austin B., Austin D.A. (2007) *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish*, 4th edn. Springer Praxis, Godalming.
- Austin B., Stobie M., Robertson P.A.W., Glass H.G., Stark J.R., Mudarris M. (1993) *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium. *Journal of Fish Diseases* **16**:277–280.
- Baccar H., Mejri M.B., Hafaiedh I., Ktari T., Aouni M., Abdelghani A. (2010) Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection. *Talanta* **82**:810–814.
- Baffone W., Citterio B., Vittoria E., Casaroli A., Campana R., Falzano L., Donelli G. (2003) Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology* **89**:31–39.

- Baffone W., Citterio B., Vittoria E., Casaroli A., Pianetti A., Campana R., Bruscolini F. (2001) Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology* **18**:479–488.
- Baffone W., Tarsi R., Pane L., Campana R., Repetto B., Mariottini G.L., Pruzzo C. (2006) Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. *Environmental Microbiology* **8**:1299–1305.
- Bagheryan Z., Raof J.B., Golabi M., Turner A.P., Beni V. (2016) Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella* Typhimurium in food sample. *Biosensors and Bioelectronics* **80**:566–573.
- Bahadır E.B., Sezgintürk M.K. (2016) Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *Trends in Analytical Chemistry* **82**:286–306.
- Baker-Austin C., Trinanes J.A., Salmenlinna S., Löfdahl M., Siitonen A., Taylor N.G., Martinez-Urtaza J. (2016) Heat Wave–Associated Vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emerging infectious diseases* **22**:1216–1220.
- Balasubramanian S., Sorokulova I.B., Vodyanoy V.J., Simonian A.L. (2007) Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus* – A surface plasmon resonance spectroscopic study. *Biosensors and Bioelectronics* **22**:948–955.
- Banin E., Vassilakos D., Orr E., Martinez R.J., Rosenberg E. (2003) Superoxide Dismutase Is a Virulence Factor Produced by the Coral Bleaching Pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology* **46**:418–422.
- Bantz K.C., Meyer A.F., Wittenberg N.J., Im H., Kurtuluş Ö., Lee S.H., Lindquist N.C., Oh S.-H., Haynes C.L. (2011) Recent progress in SERS biosensing. *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**:11551–11567.
- Baticados M.C.L., Lavilla-Pitogo C.R., Cruz-Lacierda E.R., De La Peña L.D., Suñaz N.A. (1990) Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Diseases of Aquatic Organisms* **9**:133–139.
- Ben Kahla-Nakbi A., Chaieb K., Bakhrouf A. (2009) Investigation of several virulence properties among *Vibrio alginolyticus* strains isolated from diseased cultured fish in Tunisia. *Diseases of Aquatic Organisms* **86**:21–28.
- Bergwerff A., Van Knapen F. (2006) Surface plasmon resonance biosensors for detection of pathogenic microorganisms: Strategies to secure food and environmental safety. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **89**:826–831.
- Beyhan S., Yildiz F.H. (2007) Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Molecular Microbiology* **63**:995–1007.
- Bifulco L., Ingianni A., Pompei R. (2013) An Internalin A Probe-Based Genosensor for *Listeria monocytogenes* Detection and Differentiation. *BioMed Research International* **2013**:1–6.
- Bidault A., Richard G.G., Le Bris C., Paillard C. (2015) Development of a Taqman real-time PCR assay for

- rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. PeerJ **3**:e1484.
- Bisharat N., Cohen D.I., Harding R.M., Falush D., Crook D.W., Peto T., Maiden M.C. (2005) Hybrid *Vibrio vulnificus*. Emerging infectious diseases **11**:30–35.
- Blackwell K.D., Oliver J.D. (2008) The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina Estuaries. The Journal of Microbiology **46**:146–153.
- Blake P.A., Merson M.H., Weaver R.E., Hollis D.G., Heublein P.C. (1979) Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. The New England Journal of Medicine **300**:1–5.
- Böer S.I., Heinemeyer E.A., Luden K., Erler R., Gerdts G., Janssen F., Brennholt N. (2013) Temporal and Spatial Distribution Patterns of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. at Recreational Beaches of the German North Sea. Microbial Ecology **65**:1052–1067.
- Böer S.I., Hedtkamp S.I., Van Beusekom J.E., Fuhrman J.A., Boetius A., Ramette A. (2009) Time- and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. The ISME journal **3**:780.
- Boyd E.F., Moyer K.L., Shi L., Waldor M.K. (2000) Infectious CTX F and the *Vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. Infection and Immunity **68**:1507–1513.
- Brosel-Oliu S., Uria N., Abramova N., Bratov A. (2015) Impedimetric Sensors for Bacteria Detection. In: Rinken T. (ed) Biosensors - Micro and Nanoscale Applications. InTech pp. 953–978.
- Buchapudi K.R., Huang X., Yang X., Ji H.-F., Thundat T. (2011) Microcantilever biosensors for chemicals and bioorganisms. The Analyst **136**:1539–1556.
- Bumbrah G.S., Sharma R.M. (2016) Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. Egyptian Journal of Forensic Sciences **6**:209–215.
- Bustin S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology **25**:169–193.
- Byrne B., Stack E., Gilmartin N., O’Kennedy R. (2009) Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. Sensors **9**:4407–4445.
- Chai D.-F., Ma Z., Yan H., Qiu Y.F., Liu H., Guo H.-D., Gao G.-G. (2015) Synergistic effect of sandwich polyoxometalates and copper–imidazole complexes for enhancing the peroxidase-like activity. RSC Advances **5**:78771–78779.
- Chakraborty S., Nair G. B., Shinoda S. (1997) Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment. Reviews on Environmental Health **12**:63–80.
- Chan K.Y., Ye W.W., Zhang Y., Xiao L.D., Leung P.H.M., Li Y., Yang M. (2013) Ultrasensitive detection of *E. coli* O157:H7 with biofunctional magnetic bead concentration via nanoporous membrane based electrochemical immunosensor. Biosensors and Bioelectronics **41**:532–537.
- Chanratchakool P., Pearson M., Limsuwan C., Roberts R.J. (1995) Oxytetracycline sensitivity of *Vibrio* species isolated from diseased black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Journal of Fish

Diseases **18**:79–82.

- Chen Y.T., Tang H.J., Chao C.M., Lai C.C. (2015) Clinical Manifestations of Non-O1 *Vibrio cholerae* Infections. PLOS ONE **10**:e0116904.
- Chen C.Y., Wu K.M., Chang Y.C., Chang C.H., Tsai H.C., Liao T.L., Liu Y.M., Chen H.J., Shen A.B.T., Li J.C., Su T.L., Shao C.P., Lee C.T., Hor L.I., Tsai S.F. (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. Genome research **13**:2577–2587.
- Chen Q., Yan Q., Wang K., Zhuang Z., Wang X. (2008) Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus. Diseases of Aquatic Organisms **80**:181–188.
- Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. (2001) The Mannose-Sensitive Hemagglutinin of *Vibrio cholerae* Promotes Adherence to Zooplankton. Applied and Environmental Microbiology **67**:3220–3225.
- Chitov T., Kirikaew P., Yungyune P., Ruengprapan N., Sontikun K. (2009) An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **28**:421–424.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry **162**:156–159.
- Chomczynski P., Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. Nature Protocols **1**:581–585.
- Chowdhury G., Pazhani G.P., Dutta D., Guin S., Dutta S., Ghosh S., Izumiya H., Asakura M., Yamasaki S., Takeda Y., Arakawa E., Watanabe H., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya M.K., Rajendran K., Nair G.B., Ramamurthy T. (2012) *Vibrio fluvialis* in Patients with Diarrhea, Kolkata, India. Emerging Infectious Diseases **18**:1868–1871.
- Chowdhury M.A.R., Xu B., Montilla R., Hasan J.A.K., Huq A., Colwell R.R. (1995) A simplified immunofluorescence technique for detection of viable cells of *Vibrio cholerae* O1 and O139. Journal of microbiological methods **24**:165–170.
- Clark L.C., Lyons C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Annals of the New York Academy of sciences **102**:29–45.
- Cleaveland S., Haydon D.T., Taylor L. (2007) Overviews of Pathogen Emergence: Which Pathogens Emerge, When and Why? In: Childs J.E., Mackenzie J.S., Richt J.A. (eds) Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission. Springer, Berlin, pp 85–111.
- Colwell R.R. (2009) Viable but not cultivable bacteria. In: Epstein S.S. (ed) Uncultivated microorganisms. Springer, Berlin, pp. 121–129.
- Colwell R. R., Huq A., Islam M. S., Aziz K. M., Yunus M., Khan N. H., Mahmud A., Sack B.R., Nair G.B., Chakraborty J., Sack D.A., Russek-Cohen E. (2003). Reduction of cholera in Bangladeshi villages by simple filtration. Proceedings of the National Academy of Sciences **100**:1051–1055.

- Connelly J.T., Baeumner A.J. (2011) Biosensors for the detection of waterborne pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**:117–127.
- Costa R., Mermoud I., Koblavi S., Morlet B., Haffner P., Berthe F., Legroumellec M., Grimont P. (1998) Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* **164**: 297–309.
- Coutard F., Pommepuy M., Loaec S., Hervio-Heath D. (2005) mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *Journal of Applied Microbiology* **98**:951–961.
- Craig L., Pique M.E., Tainer J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* **2**:363–378.
- Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L., Ottaviani D., Pruzzo C., Serratore P., Fischetti R., Goffredo E., Loffredo G., Mioni R., and the *Vibrio parahaemolyticus* Working Group (2007) Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* **102**:229–237.
- Damborský P., Švitel J., Katrlík J. (2016) Optical biosensors. *Essays In Biochemistry* **60**:91–100.
- Das R., Goel A.K., Sharma M.K., Upadhyay S. (2015) Electrochemical DNA sensor for anthrax toxin activator gene *atxA* detection of PCR amplicons. *Biosensors and Bioelectronics* **74**:939–946.
- Das R., Sharma M.K., Rao V.K., Bhattacharya B.K., Garg I., Venkatesh V., Upadhyay S. (2014) An electrochemical genosensor for *Salmonella typhi* on gold nanoparticles-mercaptopilane modified screen printed electrode. *Journal of Biotechnology* **188**:9–16.
- Da-Silva E., Barthelmebs L., Baudart J. (2017) Development of a PCR-free DNA-based assay for the specific detection of *Vibrio* species in environmental samples by targeting the 16S rRNA. *Environmental Science and Pollution Research* **24**:5690–5700.
- DePaola A., Nordstrom J.L., Bowers J.C., Wells J.G., Cook D.W. (2003) Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:1521–1526.
- Deter J., Lozach S., Derrien A., Véron A., Chollet J., Hervio-Heath D. (2010) Chlorophyll a might structure a community of potentially pathogenic culturable *Vibrionaceae*. Insights from a one-year study of water and mussels surveyed on the French Atlantic coast: Chlorophyll a and the *Vibrionaceae* community in mussels. *Environmental Microbiology Reports* **2**:185–191.
- Dick M.H., Guillermin M., Moussy F., Chaignat C.-L. (2012) Review of Two Decades of Cholera Diagnostics – How Far Have We Really Come ? *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**:e1845.
- Domínguez Renedo O., Alonso-Lomillo M.A., Martínez M.J.A. (2007) Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* **73**:202–219.
- Donnenberg M.S. (2000) Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* **406**:768–774.
- Duan J., Su Y.C. (2005) Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Two Oregon Oyster-growing Bays. *Journal of food science* **70**:58–63.
- Duan Q., Zhou M., Zhu L., Zhu G. (2013) Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic*

Microbiology **53**:1–8.

- Dubert J., Balboa S., Regueira M., González-Castillo A., Gómez-Gil B., Romalde J.L. (2016) *Vibrio barjaei* sp. nov., a new species of the Mediterranei clade isolated in a shellfish hatchery. Systematic and Applied Microbiology **39**:553–556.
- Dubert J., Barja J.L., Romalde J.L. (2017) New Insights into Pathogenic Vibrios Affecting Bivalves in Hatcheries: Present and Future Prospects. Frontiers in Microbiology **8**:762.
- Dudak F.C., Boyacı İ.H. (2009) Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors. Biotechnology Journal **4**:1003–1011.
- Duperthuy M., Schmitt P., Garzon E., Caro A., Rosa R.D., Le Roux F., Lautredou-Audouy N., Got P., Romestand B., de Lorgeril J., Kieffer-Jaquinod S., Bachere E., Destoumieux-Garzon D. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**:2993–2998.
- Dziejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., Rahman M.H., Heidelberg J.F., Decker J., Li L., Montgomery K.T., Grills G., Kucherlapati R., Mekalanos J.J. (2005) Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**:3465–3470.
- Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. Nature **365**:556–568.
- Egidius E., Wiik R., Andersen K., Hoff K.A., Hjeltnes B. (1986) *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **36**:518–520.
- Eiler A., Johansson M., Bertilsson S. (2006) Environmental Influences on *Vibrio* Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). Applied and Environmental Microbiology **72**:6004–6011.
- Ellington A.D., Szostak J.W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature **346**:818–822.
- Fang G., Hammar S., Grumet R. (1992) A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. BioTechniques **13**:52–55.
- Farjami E., Clima L., Gothelf K.V., Ferapontova E.E. (2010) DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific. Analyst **135**:1443–1448.
- Faury N. (2004) *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **54**:2137–2140.
- Foster J.S., Apicella M.A., McFall-Ngai M.J. (2000) *Vibrio fischeri* Lipopolysaccharide Induces Developmental Apoptosis, but Not Complete Morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* Symbiotic Light Organ. Developmental Biology **226**:242–254.
- Fouz B., Alcaide E., Barrera R., Amaro C. (2002) Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to

- vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Aquaculture* **212**:21–30.
- Fries J.S., Characklis G.W., Noble R.T. (2008) Sediment–water exchange of *Vibrio* sp. and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Research* **42**:941–950.
- Fritz J. (2008) Cantilever biosensors. *The Analyst* **133**:855–863.
- Fujino T., Okuno Y., Nakada D., Aoyama A., Mukai T., Ueho T. (1953). On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Medical journal of Osaka University* **4**:299–304.
- Fukushima H., Seki R. (2004) Ecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in brackish environments of the Sada River in Shimane Prefecture, Japan. *FEMS Microbiology Ecology* **48**:221–229.
- Gao Z., Liu N. (2013) Rapid detection for pollutants and bacteria based on quartz crystal microbalance biosensor. In: Novak B., Marek P. (eds) *New Developments in Quartz Research*. Nova Science Publishers, pp. 171–192.
- García T., Revenga-Parra M., Añorga L., Arana S., Pariente F., Lorenzo E. (2012) Disposable DNA biosensor based on thin-film gold electrodes for selective *Salmonella* detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **161**:1030–1037.
- Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M., Nicolas J.L. (2007) Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* **53**:187-96.
- Garnier M., Labreuche Y., Nicolas J.L. (2008) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology* **31**:358–365.
- Garrido-Maestu A., Chapela M.-J., Peñaranda E., Vieites J.M., Cabado A.G. (2014) In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). *Food Control* **37**:371–379.
- Garrido-Maestu A., Chapela M.-J., Vieites J.M., Cabado A.G. (2015) *lolB* gene, a valid alternative for qPCR detection of *Vibrio cholerae* in food and environmental samples. *Food Microbiology* **46**:535–540.
- Gatesoupe F.J., Lambert C., Nicolas J.-L. (1999) Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology* **87**:757–763.
- Gau J.J., Lan E.H., Dunn B., Ho C.M., Woo J.C. (2001) A MEMS based amperometric detector for *E. coli* bacteria using self-assembled monolayers. *Biosensors and Bioelectronics* **16**:745–755.
- Gauger E., Smolowitz R., Uhlinger K., Casey J., Gómez-Chiarri M. (2006) *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture* **260**:10–20.
- Gauthier G., Lafay B., Ruimy R., Breittmayer V., Nicolas J.-L., Gauthier M., Christen R. (1995) Small-Subunit rRNA Sequences and Whole DNA Relatedness Concur for the Reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the Genus *Photobacterium* as

- Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **45**:139–144.
- Gay M., Renault T., Pons A.-M., Le Roux F. (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Diseases of aquatic organisms **62**:65–74.
- Genard B., Miner P., Nicolas J.-L., Moraga D., Boudry P., Pernet F., Tremblay R. (2013) Integrative Study of Physiological Changes Associated with Bacterial Infection in Pacific Oyster Larvae. PLoS ONE **8**:e64534.
- Gil A.I., Louis V.R., Rivera I.N.G., Lipp E., Huq A., Lanata C.F., Taylor D.N., Russek-Cohen E., Choopun N., Sack R.B., Colwell R.R. (2004) Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru. Environmental Microbiology **6**:699–706.
- Girard L., Peuchet S., Servais P., Henry A., Charni-Ben-Tabassi N., Baudart J. (2017) Spatiotemporal Dynamics of Total Viable *Vibrio* spp. in a NW Mediterranean Coastal Area. Microbes and environments **32**:210–218.
- Goarant C., Herlin J., Brizard R., Marteau A.-L., Martin C., Martin B. (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. Diseases of aquatic organisms **40**:101–107.
- Goel A.K., Tamrakar A.K., Kamboj D.V., Singh L. (2005) Direct immunofluorescence assay for rapid environmental detection of *Vibrio cholerae* O1. Folia microbiologica **50**:448–452.
- Gomez-Gil B. (2004) Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology **150**:1769–1777.
- Gomez-Leon J., Villamil L., Lemos M.L., Novoa B., Figueras A. (2005) Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from Aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Larvae Associated with Mass Mortalities. Applied and Environmental Microbiology **71**:98–104.
- Goodell K.H., Jordan M.R., Graham R., Cassidy C., Nasraway S.A. (2004) Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: A hyperaggressive variant. Critical Care Medicine **32**:278–281.
- Guilbault G.G., Montalvo J.G. (1969) Enzyme electrode for the substrate urea. Journal of the American Chemical Society **92**:2533–2538.
- Gupta R., Chaudhury N.K. (2007) Entrapment of biomolecules in sol–gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. Biosensors and Bioelectronics **22**:2387–2399.
- Halford C., Gau V., Churchill B.M., Haake D.A. (2013) Bacterial Detection & Identification Using Electrochemical Sensors. Journal of Visualized Experiments **74**:e4282.
- Hammond J.L., Formisano N., Estrela P., Carrara S., Tkac J. (2016) Electrochemical biosensors and nanobiosensors. Essays In Biochemistry **60**:69–80.
- Hamula C.L.A., Zhang H., Li F., Wang Z., Chris Le X., Li X.F. (2011) Selection and analytical applications of aptamers binding microbial pathogens. Trends in Analytical Chemistry **30**:1587–1597.
- Hansen W., Freney J., Benyagoub H., Letouzey M.N., Gigi J., Wauters G. (1993) Severe human infections caused by *Vibrio metschnikovii*. Journal of Clinical Microbiology **31**:2529–2530.

- Hao R.Z., Song H.B., Zuo G.M., Yang R.F., Wei H.P., Wang D.B., Cui Z.Q., Zhang Z., Cheng Z.X., Zhang X.E. (2011) DNA probe functionalized QCM biosensor based on gold nanoparticle amplification for *Bacillus anthracis* detection. *Biosensors and Bioelectronics* **26**:3398–3404.
- Hao Y., Wang Y., Bi Z., Sun B., Jin Y., Bai Y., Chen B., Shao C., Sun X., Lu Z. (2015) A case of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* septicemia and meningitis in a neonate. *International Journal of Infectious Diseases* **35**:117–119.
- Harris J.B., LaRocque R.C., Qadri F., Ryan E.T., Calderwood S.B. (2012) Cholera. *The Lancet* **379**:2466–2476.
- Hart J.P., Crew A., Crouch E., Honeychurch K.C., Pemberton R.M. (2004) Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analysis. *Analytical Letters* **37**:789–830.
- Hayman R.B. (2008) Fiber optic biosensors for bacterial detection. In: Zourob M., Elwary S., Tuner A (eds). *Principles of Bacterial Detection : Biosensors Recognition Receptors and Microsystems*. Springer, New York, pp. 125–137.
- Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C., Fraser C.M. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477– 483.
- Heidelberg J.F., Heidelberg K.B., Colwell R.R. (2002) Bacteria of the -Subclass Proteobacteria Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:5498–5507.
- Henke J.M., Bassler B.L. (2004) Quorum Sensing Regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* **186**:3794–3805.
- Hill V.R., Kahler A.M., Jothikumar N., Johnson T.B., Hahn D., Cromeans T.L. (2007) Multistate Evaluation of an Ultrafiltration-Based Procedure for Simultaneous Recovery of Enteric Microbes in 100-Liter Tap Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4218–4225.
- Hill V.R., Polaczyk A.L., Hahn D., Narayanan J., Cromeans T.L., Roberts J.M., Amburgey J.E. (2005) Development of a Rapid Method for Simultaneous Recovery of Diverse Microbes in Drinking Water by Ultrafiltration with Sodium Polyphosphate and Surfactants. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:6878–6884.
- Hinestrosa F., Madeira R.G., Bourbeau P.P. (2007) Severe Gastroenteritis and Hypovolemic Shock Caused by *Grimontia (Vibrio) hollisae* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:3462–3463.
- Hollis D.G., Weaver R.E., Baker C.N., Thornsberry C. (1976) Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiololy* **3**:425–431.
- Holm K.O., Nilsson K., Hjerde E., Willassen N.-P., Milton D.L. (2015) Complete genome sequence of *Vibrio anguillarum* strain NB10, a virulent isolate from the Gulf of Bothnia. *Standards in Genomic Sciences* **10**:60.
- Horseman M.A., Surani S. (2011) A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *International Journal of Infectious Diseases*

15:157–166.

- Hsieh J.L., Fries J.S., Noble R.T. (2007) *Vibrio* and phytoplankton dynamics during the summer of 2004 in a eutrophying estuary. *Ecological Applications* **17**:102–109.
- Hsieh Y.C., Liang S.M., Tsai W.L., Chen Y.H., Liu T.Y., Liang C.M. (2003) Study of Capsular Polysaccharide from *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity* **71**:3329–3336.
- Huq A., Sack R.B., Nizam A., Longini I.M., Nair G.B., Ali A., Morris J.G., Khan M.N.H., Siddique A.K., Yunus M., Albert M.J., Sack D.A., Colwell R.R. (2005) Critical Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Environment of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:4645–4654.
- Ifremer (2013) *Vibrio splendidus* and *V. aestuarianus* detection by Real Time Polymerase Chain Reaction. European Union Reference Laboratory for Molluscs Diseases. In: L. d. G. e. P. d. M. Marins.
- Izadi Z., Sheikh-Zeinoddin M., Ensafi A.A., Soleimani-Zad S. (2016) Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Biosensors and Bioelectronics* **80**:582–589.
- Jain S. (2012) Development of an Antibody Functionalized Carbon Nanotube Biosensor for Foodborne Bacterial Pathogens. *Journal of Biosensors & Bioelectronics* **11**:1–7.
- Jayasree L., Janakiram P., Madhavi R. (2006) Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society* **37**:523–532.
- Jeffries V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **29**:201–226.
- Johnson C.N. (2015) Influence of Environmental Factors on *Vibrio* spp. in Coastal Ecosystems. *Microbiology Spectrum* **3**:VE-0008-2014.
- Johnson C.N., Bowers J.C., Griffitt K.J., Molina V., Clostio R.W., Pei S., Laws E., Paranjpye R.N., Strom M.S., Chen A., Hasan N.A., Huq A., Noriega N.F., Grimes D.J., Colwell R.R. (2012) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the Coastal and Estuarine Waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Applied and Environmental Microbiology* **78**:7249–7257.
- Jones M.K., Oliver J.D. (2009) *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity* **77**:1723–1733.
- Jung J.H., Cheon D.S., Liu F., Lee K.B., Seo T.S. (2010) A Graphene Oxide Based Immuno-biosensor for Pathogen Detection. *Angewandte Chemie International Edition* **49**:5708–5711.
- Kahraman M., Mullen E.R., Korkmaz A., Wachsmann-Hogiu S. (2017) Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing. *Nanophotonics* **6**:831–852.
- Kang I. H., Kim J.S., Lee J.K. (2007) The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**:1399–1402.
- Kerman K., Matsubara Y., Morita Y., Takamura Y., Tamiya E. (2004) Peptide nucleic acid modified

- magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization. *Science and Technology of Advanced Materials* **5**:351–357.
- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J., Gibson L. (2009) Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius* -like isolate. *Journal of Fish Diseases* **32**:499–507.
- Kesarcodi-Watson A., Miner P., Nicolas J.L., Robert R. (2012) Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* **344–349**:29–34.
- Khemthongcharoen N., Wonglumsom W., Suppat A., Jaruwongrungrsee K., Tuantranont A., Promptmas C. (2015) Piezoresistive microcantilever-based DNA sensor for sensitive detection of pathogenic *Vibrio cholerae* O1 in food sample. *Biosensors and Bioelectronics* **63**:347–353.
- Khuntia C.P., Das B.K., Samantaray B.R., Samal S.K., Mishra B.K. (2008) Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* **39**:301–310.
- Ki J.S., Zhang R., Zhang W., Huang Y.L., Qian P.Y. (2009) Analysis of RNA Polymerase Beta Subunit (*rpoB*) Gene Sequences for the Discriminative Power of Marine *Vibrio* Species. *Microbial Ecology* **58**:679–691.
- Kiiyukia C., Nakajima A., Nakai T., Muroga K., Kawakami H., Hashimoto H. (1992) *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. *Applied and environmental microbiology* **58**:3078–3082.
- Kim G., Moon J.-H., Moh C.-Y., Lim J. (2015) A microfluidic nano-biosensor for the detection of pathogenic Salmonella. *Biosensors and Bioelectronics* **67**:243–247.
- Kim Y., Sohn D., Tan W. (2008) Molecular beacons in biomedical detection and clinical diagnosis. *International journal of clinical and experimental pathology* **1**:105–116.
- Kirn T.J., Lafferty M.J., Sandoe C.M., Taylor R.K. (2000) Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology* **35**:896–910.
- Kirschner A.K.T., Schauer S., Steinberger B., Wilhartitz I., Grim C.J., Huq A., Colwell R.R., Herzig A., Sommer R. (2011) Interaction of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 with Copepods, Cladocerans and Competing Bacteria in the Large Alkaline Lake Neusiedler See, Austria. *Microbial Ecology* **61**:496–506.
- Kolpashchikov D.M. (2012) An Elegant Biosensor Molecular Beacon Probe: Challenges and Recent Solutions. *Scientifica* **2012**:1–17.
- Koncki R. (2007) Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta* **599**:7–15.
- Kotanen C.N., Martinez L., Alvarez R., Simecek J.W. (2016) Surface enhanced Raman scattering spectroscopy for detection and identification of microbial pathogens isolated from human serum. *Sensing and Bio-Sensing Research* **8**:20–26.

- Kuang H., Cui G., Chen X., Yin H., Yong Q., Xu L., Peng C., Wang L., Xu C. (2013) A One-Step Homogeneous Sandwich Immunosensor for *Salmonella* Detection Based on Magnetic Nanoparticles (MNPs) and Quantum Dots (QDs). *International Journal of Molecular Sciences* **14**:8603–8610.
- Kwok A.Y., Wilson J.T., Coulthart M., Ng L.-K., Mutharia L., Chow A.W. (2002) Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *hsp 60* gene sequences. *Canadian Journal of Microbiology* **48**:903–910.
- Laczka O., Labbate M., Doblin M. (2014) Application of an ELISA-type amperometric assay to the detection of *Vibrio* species with screen-printed electrodes. *Analytical Methods* **6**:2020–2023.
- Ladagnous H., Le Bec C. (1997) Lagune de Salse-Leucate. Analyse bibliographique. Ifremer, Sète. p. 14.
- Lambert C., Nicolas J.-L., Cilia V., Corre S. (1998) *Vibrio pectenica* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **48**:481–487.
- Lavilla-Pitogo C.R., Baticados M.C.L., Cruz-Lacierda E.R., de la Peña L.D. (1990) Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* **91**:1–13.
- Le T.T.T., Mawatari K., Maetani M., Yamamoto T., Hayashida S., Iba H., Aihara M., Hirata A., Shimohata T., Uebanso T., Takahashi A. (2012) VP2118 has major roles in *Vibrio parahaemolyticus* response to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1820**:1686–1692.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J.-L., Gouy M., Berthe F.C.J. (2004) Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of aquatic organisms* **58**:143–150.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.-L., Berthe F. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* **15**:251–258.
- Le Roux F., Wegner K.M., Baker-Austin C., Vezzulli L., Osorio C.R., Amaro C., Ritchie J.M., Defoirdt T., Destoumieux-Garzón D., Blokesch M., Mazel D., Jacq A., Cava F., Gram L., Wendling C.C., Strauch E., Kirschner A., Huehn S. (2015) The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in Microbiology* **6**:830.
- Le Roux F., Zouine M., Chakroun N., Binesse J., Saulnier D., Bouchier C., Zidane N., Ma L., Rusniok C., Lajus A., Buchrieser C., Médigue C., Polz M.F., Mazel D. (2009) Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environmental Microbiology* **11**:1959–1970.
- Lee B.C., Choi S.H., Kim T.S. (2008) *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection* **10**:1504–1513.
- Lee K.K., Liu P.C., Chuang W.H. (2002) Pathogenesis of Gastroenteritis Caused by *Vibrio carchariae* in Cultured Marine Fish. *Marine Biotechnology* **4**:267–277.
- Lee J.-H., Rho J.B., Park K.-J., Kim C.B., Han Y.-S., Choi S.H., Lee K.-H., Park S.-J. (2004) Role of Flagellum

- and Motility in Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* **72**:4905–4910.
- Leskinen S.D., Lim D.V. (2008) Rapid Ultrafiltration Concentration and Biosensor Detection of Enterococci from Large Volumes of Florida Recreational Water. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:4792–4798.
- Li Q., Cheng W., Zhang D., Yu T., Yin Y., Ju H., Ding S. (2012) Rapid and sensitive strategy for *Salmonella* detection using an InvA gene-based electrochemical DNA sensor. *International Journal of Electrochemical Science* **7**:844–856.
- Li K., Lai Y., Zhang W., Jin L. (2011) Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for *Escherichia coli* detection. *Talanta* **84**:607–613.
- Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* **5**:258.
- Li Y., Schluesener H., Xu S. (2010) Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin* **43**:29–41.
- Li J., Zhou L., Woo N.Y.S. (2003) Invasion Route and Pathogenic Mechanisms of *Vibrio alginolyticus* to Silver Sea Bream *Sparus sarba*. *Journal of Aquatic Animal Health* **15**:302–313.
- Liao W.C., Ho J.A. (2009) Attomole DNA Electrochemical Sensor for the Detection of *Escherichia coli* O157. *Analytical Chemistry* **81**:2470–2476.
- Liao J.C., Mastali M., Gau V., Suchard M.A., Moller A.K., Bruckner D.A., Babbitt J.T., Li Y., Gornbein J., Landaw E.M., McCabe E.R.B., Churchill B.M., Haake D.A. (2006) Use of Electrochemical DNA Biosensors for Rapid Molecular Identification of Uropathogens in Clinical Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:561–570.
- Liao J.C., Mastali M., Li Y., Gau V., Suchard M.A., Babbitt J., Gornbein J., Landaw E.M., McCabe E.R.B., Churchill B.M., Haake D.A. (2007) Development of an Advanced Electrochemical DNA Biosensor for Bacterial Pathogen Detection. *The Journal of Molecular Diagnostics* **9**:158–168.
- Liébana S., Brandão D., Cortés P., Campoy S., Alegret S., Pividori M.I. (2016) Electrochemical genosensing of *Salmonella*, *Listeria* and *Escherichia coli* on silica magnetic particles. *Analytica Chimica Acta* **904**:1–9.
- Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C., Mekalanos J.J. (1999) Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:1071–1076.
- Lin J., Huang S., Zhang Q. (2002) Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and infection* **4**:325–331.
- Lipp E.K., Rodriguez-Palacios C., Rose J.B. (2001) Occurrence and distribution of the human pathogen *Vibrio vulnificus* in a subtropical Gulf of Mexico estuary. In: *The Ecology and Etiology of Newly Emerging Marine Diseases*. Springer, pp 165–173.
- Liu C.H., Cheng W., Hsu J.P., Chen J.C. (2004) *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of aquatic organisms* **61**:169–174.

- Liu X., Gao H., Xiao N., Liu Y., Li J., Li L. (2015) Outer Membrane Protein U (OmpU) Mediates Adhesion of *Vibrio mimicus* to Host Cells via Two Novel N-Terminal Motifs. *PLoS ONE* **10**:e0119026.
- Loaiza Ó.A., Campuzano S., Pedrero M., García P., Pingarrón J.M. (2009) Ultrasensitive detection of coliforms by means of direct asymmetric PCR combined with disposable magnetic amperometric genosensors. *The Analyst* **134**:34–37.
- Lodeiros C., Bolinches J., Dopazo C.P., Toranzo A.E. (1987) Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**:15–29.
- Low K.F., Chuenrangsikul K., Rijiravanich P., Surareungchai W., Chan Y.Y. (2012) Electrochemical genosensor for specific detection of the food-borne pathogen, *Vibrio cholerae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**:1699–1706.
- Low K.-F., Zain Z.M., Yean C.Y. (2017) A signal-amplified electrochemical DNA biosensor incorporated with a colorimetric internal control for *Vibrio cholerae* detection using shelf-ready reagents. *Biosensors and Bioelectronics* **87**:256–263.
- Lowe C.R. (2007) Overview of biosensor and bioarray technologies. In: *Handbook of Biosensors and Biochips*. Marks R.S., Culen D.C., Weetall H.H, Karube I. (Eds). Wiley pp. 1–16.
- Luque Fernández M.Á., Bauernfeind A., Jiménez J.D., Gil C.L., Omeiri N.E., Guibert D.H. (2009) Influence of temperature and rainfall on the evolution of cholera epidemics in Lusaka, Zambia, 2003–2006: analysis of a time series. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**:137–143.
- Main C.R., Salvitti L.R., Whereat E.B., Coyne K.J. (2015) Community-Level and Species-Specific Associations between Phytoplankton and Particle-Associated *Vibrio* Species in Delaware's Inland Bays. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:5703–5713.
- Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M., Iida T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**:743–749.
- Mandal S., Mandal M.D., Pal N.K. (2011) Cholera: a great global concern. *Asian Pacific journal of tropical medicine* **4**:573–580.
- Mann T.L., Krull U.J. (2004) The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **20**:945–955.
- Marco-Noales E., Biosca E.G., Milán M., Amaro C. (2000) An indirect immunofluorescent antibody technique for detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2): development and applications. *Journal of applied microbiology* **89**:599–606.
- Martínez-Paredes G., González-García M.B., Costa-García A. (2010) Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **149**:329–335.
- Martinez-Urtaza J., Baker-Austin C., Jones J.L., Newton A.E., Gonzalez-Aviles G.D., DePaola A. (2013) Spread of Pacific Northwest *Vibrio parahaemolyticus* strain. *New England Journal of Medicine* **369**:1573–1574.

- Martinez-Urtaza J., Blanco-Abad V., Rodriguez-Castro A., Ansele-Bermejo J., Miranda A., Rodriguez-Alvarez M.X. (2012) Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *The ISME journal* **6**:994–1006.
- Martinez-Urtaza J., Lozano-Leon A., Varela-Pet J., Trinanés J., Pazos Y., Garcia-Martin O. (2008) Environmental Determinants of the Occurrence and Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Rias of Galicia, Spain. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:265–274.
- Mascini M., Palchetti I., Tombelli S. (2012) Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Fundamentals and Bioanalytical Aspects. *Angewandte Chemie International Edition* **51**:1316–1332.
- Matz C., McDougald D., Moreno A.M., Yung P.Y., Yildiz F.H., Kjelleberg S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:16819–16824.
- Mayer G. (2009) The Chemical Biology of Aptamers. *Angewandte Chemie International Edition* **48**:2672–2689.
- McCarter L.L. (2001) Polar Flagellar Motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**:445–462.
- McFall-Ngai M. (2014) Divining the Essence of Symbiosis: Insights from the Squid-Vibrio Model. *PLoS Biology* **12**:e1001783.
- Mehrotra P. (2016) Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **6**:153–159.
- Mondal M., Nag D., Koley H., Saha D.R., Chatterjee N.S. (2014) The *Vibrio cholerae* Extracellular Chitinase ChiA2 Is Important for Survival and Pathogenesis in the Host Intestine. *PLoS ONE* **9**:e103119.
- Montagut Y., Narbon J.G., Jiménez Y., March C., Montoya Á., Arnau A. (2011) QCM technology in biosensors. In: *Biosensors-Emerging Materials and Applications*. Serra P.A. (Ed). InTech, pp. 153–173.
- Mookerjee S., Jaiswal A., Batabyal P., Einsporn M.H., Lara R.J., Sarkar B., Neogi S.B., Palit A. (2014) Seasonal dynamics of *Vibrio cholerae* and its phages in riverine ecosystem of Gangetic West Bengal: cholera paradigm. *Environmental Monitoring and Assessment* **186**:6241–6250.
- Morales-Morales H.A., Vidal G., Olszewski J., Rock C.M., Dasgupta D., Oshima K.H., Smith G.B. (2003) Optimization of a Reusable Hollow-Fiber Ultrafilter for Simultaneous Concentration of Enteric Bacteria, Protozoa, and Viruses from Water. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:4098–4102.
- Muhammad-Tahir Z., Alocilja E.C. (2003) A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors and Bioelectronics* **18**:813–819.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**:4321–4326.
- Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Dutta B., Takeda Y., Sack D.A. (2007) Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. *Clinical Microbiology Reviews* **20**:39–48.

- Naka H., Crosa J.H. (2012) Identification and characterization of a novel outer membrane protein receptor FetA for ferric enterobactin transport in *Vibrio anguillarum* 775 (pJM1). *BioMetals* **25**:125–133.
- Narracci M., Acquaviva M.I., Cavallo R.A. (2014) Mar Piccolo of Taranto: *Vibrio* biodiversity in ecotoxicology approach. *Environmental Science and Pollution Research* **21**:2378–2385.
- Nayak M., Kotian A., Marathe S., Chakravortty D. (2009) Detection of microorganisms using biosensors—A smarter way towards detection techniques. *Biosensors and Bioelectronics* **25**:661–667
- Newton A., Kendall M., Vugia D.J., Henao O.L., Mahon B.E. (2012) Increasing Rates of Vibriosis in the United States, 1996-2010: Review of Surveillance Data From 2 Systems. *Clinical Infectious Diseases* **54**:391–395.
- Nguyen H., Park J., Kang S., Kim M. (2015) Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors* **15**:10481–10510.
- Nhung P.H., Shah M.M., Ohkusu K., Noda M., Hata H., Sun X.S., Iihara H., Goto K., Masaki T., Miyasaka J., Ezaki T. (2007) The *dnaJ* gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Systematic and Applied Microbiology* **30**:309–315.
- Nielsen P.E., Egholm M., others (1999) An introduction to peptide nucleic acid. *Current Issues Molecular Biology* **1**:89–104.
- Nordin N., Yusof N.A., Abdullah J., Radu S., Hushiarian R. (2016) Sensitive detection of multiple pathogens using a single DNA probe. *Biosensors and Bioelectronics* **86**:398–405.
- Nordin N., Yusof N.A., Abdullah J., Radu S., Hushiarian R. (2017) A simple, portable, electrochemical biosensor to screen shellfish for *Vibrio parahaemolyticus*. *AMB Express* **7**:41.
- Oberbeckmann S., Fuchs B.M., Meiners M., Wichels A., Wiltshire K.H., Gerdt G. (2012) Seasonal Dynamics and Modeling of a *Vibrio* Community in Coastal Waters of the North Sea. *Microbial Ecology* **63**:543–551.
- Okuda J., Ishibashi M., Hayakawa E., Nishino T., Takeda Y., Mukhopadhyay A.K., Garg S., Bhattacharya S.K., Nair G.B., Nishibuchi M. (1997) Emergence of a unique O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:3150–3155.
- Ontweka L.N., Deng L.O., Rauzier J., Debes A.K., Tadesse F., Parker L.A., Wamala J.F., Bior B.K., Lasuba M., But A.B., Grandesso F., Jamet C., Cohuet S., Ciglenecki I., Serafini M., Sack D.A., Quilici M.L., Azman A.S., Luquero F.L., Page A.L. (2016) Cholera Rapid Test with Enrichment Step Has Diagnostic Performance Equivalent to Culture. *PLoS one* **11**:e0168257.
- Oliver J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology* **43**:93–100.
- Oliver J.D. (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:415–425.
- Olson R., Gouaux E. (2003) *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. *Protein Science* **12**:379–383.

- Paillard C., Gausson S., Nicolas J.L., le Penec J.P., Haras D. (2006) Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* **253**:25–38.
- Palchetti I., Mascini M. (2008) *Amperometric Biosensors for Pathogenic Bacteria Detection*. Springer, New York, pp. 299–312.
- Paniel N., Baudart J. (2013) Colorimetric and electrochemical genosensors for the detection of *Escherichia coli* DNA without amplification in seawater. *Talanta* **115**:133–142.
- Parab H.J., Jung C., Lee J.-H., Park H.G. (2010) A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* **26**:667–673.
- Park J.Y., Jeon S., Kim J.Y., Park M., Kim S. (2013) Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for Simultaneous Detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Osong Public Health and Research Perspectives* **4**:133–139.
- Park K.-S., Ono T., Rokuda M., Jang M.-H., Okada K., Iida T., Honda T. (2004) Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity* **72**:6659–6665.
- Parveen S., Hettiarachchi K.A., Bowers J.C., Jones J.L., Tamplin M.L., McKay R., Beatty W., Brohawn K., DaSilva L.V., DePaola A. (2008) Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology* **128**:354–361.
- Patel M.K., Ali M.A., Krishnan S., Agrawal V.V., Al Kheraif A.A., Fouad H., Ansari Z.A., Ansari S.G., Malhotra B.D. (2015) A Label-Free Photoluminescence Genosensor Using Nanostructured Magnesium Oxide for Cholera Detection. *Scientific Reports* **5**:17384.
- Patel M.K., Ali M.A., Srivastava S., Agrawal V.V., Ansari S.G., Malhotra B.D. (2013b) Magnesium oxide grafted carbon nanotubes based impedimetric genosensor for biomedical application. *Biosensors and Bioelectronics* **50**:406–413.
- Patel M.K., Ali M.A., Zafaryab M., Agrawal V.V., Rizvi M.M.A., Ansari Z.A., Ansari S.G., Malhotra B.D. (2013a) Biocompatible nanostructured magnesium oxide-chitosan platform for genosensing application. *Biosensors and Bioelectronics* **45**:181–188.
- Paul J., Scholin C., van den Engh G., Perry, M. J. (2007) In situ Instrumentation. *Oceanography* **20**:58–66.
- Payne S.M., Mey A.R., Wyckoff E.E. (2016) *Vibrio* Iron Transport: Evolutionary Adaptation to Life in Multiple Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **80**:69–90.
- Pérez-Cataluña A., Lucena T., Tarazona E., Arahál D.R., Macián M.C., Pujalte M.J. (2016) An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio* spp. *Systematic and Applied Microbiology* **39**:361–369.
- Pernet F., Barret J., Le Gall P., Corporeau C., Dégremont L., Lagarde F., Pépin J., Keck N. (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture Environment Interactions* **2**:215–237.

- Petti C.A., Polage C.R., Schreckenberger P. (2005) The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:6123–6125.
- Petton B., Boudry P., Alunno-Bruscia M., Pernet F. (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **6**:205–222.
- Petton B., Pernet F., Robert R., Boudry P. (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **3**:257–273.
- Pfeffer C.S., Hite M.F., Oliver J.D. (2003) Ecology of *Vibrio vulnificus* in Estuarine Waters of Eastern North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:3526–3531.
- Pohanka M., Skládal P. (2008) Electrochemical biosensors—principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine* **6**:57–64.
- Poitras E., Houde A. (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology* **2**:2–11.
- Pollock F.J., Morris P.J., Willis B.L., Bourne D.G. (2010) Detection and Quantification of the Coral Pathogen *Vibrio coralliilyticus* by Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:5282–5286.
- Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter* **15**:8–15.
- Poshtiban S., Singh A., Fitzpatrick G., Evoy S. (2013) Bacteriophage tail-spike protein derivitized microresonator arrays for specific detection of pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical* **181**:410–416.
- Prabhakar N., Singh H., Malhotra B.D. (2008) Nucleic acid immobilized polypyrrole–polyvinylsulphonate film for *Mycobacterium tuberculosis* detection. *Electrochemistry Communications* **10**:821–826.
- Prado S., Dubert J., Romalde J.L., Toranzo A.E., Barja J.L. (2014) *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:1641–1646.
- Prado S., Romalde J.L., Montes J., Barja J.L. (2005) Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Diseases of aquatic organisms* **67**:209–215.
- Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R., Donelli G. (2005) Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. In : *Oceans and health: pathogens in the marine environment* pp. 217–252.
- Qadri F., Svennerholm A.-M., Shamsuzzaman S., Bhuiyan T.R., Harris J.B., Ghosh A.N., Nair G.B., Weintraub A., Faruque S.M., Ryan E.T., Sack D.A., Calderwood S.B. (2005) Reduction in Capsular Content and Enhanced Bacterial Susceptibility to Serum Killing of *Vibrio cholerae* O139 Associated with the 2002 Cholera Epidemic in Bangladesh. *Infection and Immunity* **73**:6577–6583.

- Ramamurthy T., Chowdhury G., Pazhani G.P., Shinoda S. (2014) *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Frontiers in Microbiology* **5**:91.
- Ransom D.P., Lannan C.N., Rohovec J.S., Fryer J.L. (1984) Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *Journal of Fish Diseases* **7**:107–115.
- Reguera G., Kolter R. (2005) Virulence and the Environment: a Novel Role for *Vibrio cholerae* Toxin-Coregulated Pili in Biofilm Formation on Chitin. *Journal of Bacteriology* **187**:3551–3555.
- Rehnstam-Holm A.-S., Atnur V., Godhe A. (2014) Defining the Niche of *Vibrio parahaemolyticus* During Pre- and Post-Monsoon Seasons in the Coastal Arabian Sea. *Microbial Ecology* **67**:57–65.
- Rehnstam-Holm A., Godhe A., Härnström K., Raghunath P., Saravanan V., Collin B., Karunasagar I., Karunasagar I. (2010) Association between phytoplankton and *Vibrio* spp. along the southwest coast of India: a mesocosm experiment. *Aquatic Microbial Ecology* **58**:127–139.
- Reilly G.D., Reilly C.A., Smith E.G., Baker-Austin C. (2011) *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. *Euro Surveill* **16**:19994.
- Richards G.P., Watson M.A., Needleman D.S., Church K.M., Häse C.C. (2015) Mortalities of Eastern and Pacific Oyster Larvae Caused by the Pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:292–297.
- Riquelme C., Toranzo A.E., Barja J.L., Vergara N., Araya R. (1996) Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *Journal of Invertebrate Pathology* **67**:213–218.
- Robert-Pillot A. (2004) Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology* **91**:319–325.
- Robert-Pillot A., Copin S., Gay M., Malle P., Quilici M.L. (2010) Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* **143**:190–197.
- Roller B.R.K., Stoddard S.F., Schmidt T.M. (2016) Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies. *Nature Microbiology* **1**:16160.
- Ruby E.G., Urbanowski M., Campbell J., Dunn A., Faini M., Gunsalus R., Lostroh P., Lupp C., McCann J., Millikan D., Schaefer A., Stabb E., Stevens A., Visick K., Whistler C., Greenberg E.P. (2005) Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:3004–3009.
- Saad N.A., Zaaba S.K., Zakaria A., Kamarudin L.M., Wan K., Shariman A.B. (2014) Quartz crystal microbalance for bacteria application review. In: *IEEE*, pp. 455–460.
- Sack D.A., Sack B. R., Nair B.G., Siddique A.K. (2004) Cholera. *Lancet* **363**:223–233.
- Sadeghi S.J. (2013) Amperometric biosensors. In: *Encyclopedia of Biophysics*. Roberts G.C.K. (eds). Springer, Verlag, Berlin, Germany, pp. 61–67.

- Samain JF, McCombie H (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Mores Project. In: Versailles: Quae Editions. pp. 379.
- Sapp M., Wichels A., Wiltshire K.H., Gerdt G. (2007) Bacterial community dynamics during the winter–spring transition in the North Sea: Bacterial community dynamics in the North Sea. *FEMS Microbiology Ecology* **59**:622–637.
- Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. (2008) DNA Biosensors and Microarrays. *Chemical Reviews* **108**:109–139.
- Saulnier D., De Decker S., Haffner P. (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods* **77**:191–197.
- Saulnier D., De Decker S., Haffner P., Cobret L., Robert M., Garcia C. (2010) A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and Correlation Between Virulence and Metalloprotease-like Activity. *Microbial Ecology* **59**:787–798.
- Sawabe T., Kita-Tsukamoto K., Thompson F.L. (2007) Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology* **189**:7932–7936.
- Sawabe T., Ogura Y., Matsumura Y., Feng G., Amin A.R., Mino S., Nakagawa S., Sawabe T., Kumar R., Fukui Y., Satomi M., Matsushima R., Thompson F.L., Gomez-Gil B., Christen R., Maruyama F., Kurokawa K., Hayashi T. (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* **4**:414.
- Schauer S., Sommer R., Farnleitner A.H., Kirschner A.K.T. (2012) Rapid and Sensitive Quantification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* Cells in Water Samples by Use of Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization Combined with Solid-Phase Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:7369–7375.
- Schets F.M., van den Berg H.H.J.L., Marchese A., Garbom S., de Roda Husman A.M. (2011) Potentially human pathogenic vibrios in marine and fresh bathing waters related to environmental conditions and disease outcome. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **214**:399–406.
- Schikorski D., Renault T., Paillard C., Bidault-Toffin A., Tourbiez D., Saulnier D. (2013) Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. *Aquaculture* **392–395**:106–112.
- Schmalenberger A., Schwieger F., Tebbe C.C. (2001) Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3557–3563.
- Schmelcher M., Loessner M.J. (2014) Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* **4**:e28137.
- Scholin C., Doucette G., Jensen S., Roman B., Pargett D., Marin III R., Preston C., Jones W., Feldman J., Everlove C., Harris A., Alvarado N., Massion E., Birch J., Greenfield D., Wheeler K., Vrijenhoek

- R., Mikulski C., Jones K. (2009) Remote Detection of Marine Microbes, Small Invertebrates, Harmful Algae, and Biotoxins using the Environmental Sample Processor (ESP). *Oceanography* **22**:158–167.
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. (2012) PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* **113**:1014–1026.
- Schrøder M.B., Espelid S., Jørgensen T.Ø. (1992) Two serotypes of *Vibrio salmonicida* isolated from diseased cod (*Gadus morhua* L.); virulence, immunological studies and vaccination experiments. *Fish & Shellfish Immunology* **2**:211–221.
- Schutz Geschwender A. (2013) Chemiluminescent Westerns: How film and photochemistry affect experimental results. LI-COR Biosciences. www.licor.com.
- Selvin J., Lipton A.P. (2003) *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms* **57**:147–150.
- Serra B., Gamella M., Reviejo A.J., Pingarrón J.M. (2008) Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**:1853–1860.
- Sha Y., Zhang X., Li W., Wu W., Wang S., Guo Z., Zhou J., Su X. (2016) A label-free multi-functionalized graphene oxide based electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seawater and seafood. *Talanta* **147**:220–225.
- Sharshar Kh.M., Azab E.A. (2008) Studies on Diseased Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Infected with *Vibrio vulnificus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **11**:2092–2100.
- Shen Z., Huang M., Xiao C., Zhang Y., Zeng X., Wang P.G. (2007) Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Analytical chemistry* **79**:2312–2319.
- Singh R., Mukherjee M.D., Sumana G., Gupta R.K., Sood S., Malhotra B.D. (2014) Biosensors for pathogen detection: A smart approach towards clinical diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical* **197**:385–404.
- Siripornadulsil W., Thongserm M., Siripornadulsil S. (2014) Pathogenicity of halophilic *Vibrio harveyi* in giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii* De Man). *Aquaculture Research* **45**:1979–1988.
- Smith G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**:1315–1317.
- Smolikova L.M., Lomov L.M., Khomenko T.V., Murnachev G.P., Kudriakova T.A., Fetsailova O.P., Sanamiants E.M., Makedonova L.D., Kachkina G.V., Golenishcheva E.N. (2001) Studies on halophilic vibrios causing a food poisoning outbreak in the city of Vladivostok. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii* **6**:3–7.
- Snoussi M., Noumi E., Usai D., Sechi L.A., Zanetti S., Bakhrouf A. (2008) Distribution of some virulence related-properties of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Mediterranean seawater (Bay of Khenis, Tunisia): investigation of eight *Vibrio cholerae* virulence genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**:2133–2141.

- Solanki P.R., Kaushik A., Chavhan P.M., Maheshwari S.N., Malhotra B. D. (2009) Nanostructured zirconium oxide based genosensor for *Escherichia coli* detection. *Electrochemistry Communications* **11**:2272–2277.
- Soto-Rodriguez S.A., Gomez-Gil B., Lozano R., del Rio-Rodríguez R., Diéguez A.L., Romalde J.L. (2012) Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**:307–317.
- Souriau C., Hua T., Lefranc M., Weill M. (1998) Présentation à la surface de phages filamenteux : Les multiples applications du phage display. *Médecine/sciences* **14**:300-9.
- Stobiecka M., Chałupa A. (2015) Biosensors based on molecular beacons. *Chemical Papers* **69**: 62–76.
- Tabrizi M.A., Shamsipur M. (2015) A label-free electrochemical DNA biosensor based on covalent immobilization of *Salmonella* DNA sequences on the nanoporous glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **69**:100–105.
- Tall A., Teillon A., Boisset C., Delesmont R., Touron-Bodilis A., Hervio-Heath D. (2012) Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. strains. *Journal of Applied Microbiology* **113**:361–372.
- Tam P.D., Thang C.X. (2016) Label-free electrochemical immunosensor based on cerium oxide nanowires for *Vibrio cholerae* O1 detection. *Materials Science and Engineering: C* **58**:953–959.
- Tamayo J., Kosaka P.M., Ruz J.J., San Paulo Á., Calleja M. (2012) Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**:1287–1311.
- Tanabe T., Funahashi T., Shiuchi K., Okajima N., Nakao H., Miyamoto K., Tsujibo H., Yamamoto S. (2012) Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. *Microbiology* **158**:2039–2049.
- Tantillo G.M., Fontanarosa M., Di Pinto A., Musti M. (2004) Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology* **39**:117–126.
- Thompson F.L. (2003) Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1615–1617.
- Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C.B., Swings J. (2005) Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:5107–5115.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. (2004) Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**:403–431.
- Thuy N.T., Tam P.D., Tuan M.A., Le A.-T., Tam L.T., Van Thu V., Van Hieu N., Chien N.D. (2012) Detection of pathogenic microorganisms using biosensor based on multi-walled carbon nanotubes dispersed in DNA solution. *Current Applied Physics* **12**:1553–1560.
- Tichoniuk M., Gwiazdowska D., Ligaj M., Filipiak M. (2010) Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **26**:1618–1623.
- Tison D.L., Nishibuchi M., Greenwood J.D., Seidler R.J. (1982) *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new

- biogroup pathogenic for eels. *Applied and Environmental Microbiology* **44**:640–646.
- Tombelli S., Minunni M., Mascini M. (2007) Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomolecular Engineering* **24**:191–200.
- Toranzo A.E., Magariños B., Romalde J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**:37–61.
- Torati S.R., Reddy V., Yoon S.S., Kim C. (2016) Electrochemical biosensor for *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection based on gold nanotubes array electrode platform. *Biosensors and Bioelectronics* **78**:483–488.
- Torkildsen L., Lambert C., Nylund A., Magnesen T., Bergh Ø. (2005) Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquaculture International* **13**:575–592.
- Tosar J.P., Brañas G., Laíz J. (2010) Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples. *Biosensors and Bioelectronics* **26**:1205–1217.
- Tran L., Nunan L., Redman R., Mohny L., Pantoja C., Fitzsimmons K., Lightner D. (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* **105**:45–55.
- Travers M.-A., Boettcher Miller K., Roque A., Friedman C.S. (2015) Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**:11–31.
- Tschmelak J., Proll G., Riedt, J. (2005) Automated water analyser computer supported system (AWACSS): I. Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design and networking. *Biosensors and Bioelectronics* **20**:1499–1508.
- Tse C., Capeau J. (2003) Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique*. **61**:279-293.
- Tubiash H.S., Chanley P.E., Leifson E. (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks I. Etiology and epizootiology. *Journal of bacteriology* **90**:1036–1044.
- Tuerk C., Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**:505–510.
- Turner J.W., Good B., Cole D., Lipp E.K. (2009) Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *The ISME journal* **3**:1082.
- Turner J.W., Paranjpye R.N., Landis E.D., Biryukov S.V., González-Escalona N., Nilsson W.B., Strom M.S. (2013) Population Structure of Clinical and Environmental *Vibrio parahaemolyticus* from the Pacific Northwest Coast of the United States. *PLoS ONE* **8**:e55726.
- Tyagi S., Kramer F.R. (1996) Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* **14**:303–308.
- Tyagi A., Saravanan V., Karunasagar I., Karunasagar I. (2009) Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green real-time PCR and evaluation of three enrichment media. *International Journal of Food Microbiology* **129**:124–130.

- Vandenbergh J., Thompson F.L., Gomez-Gil B., Swings J. (2003) Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* **219**:9–20.
- Vashist S.K., Vashist P. (2011) Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors. *Journal of Sensors* **2011**:1–13.
- Vezzulli L., Pezzati E., Moreno M., Fabiano M., Pane L., Pruzzo C., the VibrioSea Consortium (2009) Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microbial Ecology* **58**:808–818.
- Vezzulli L., Previati M., Pruzzo C., Marchese A., Bourne D.G., Cerrano C., the VibrioSea Consortium (2010) *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sae. *Environmental Microbiology* **12**:2007–2019.
- Vijian D., Chinni S.V., Yin L.S., Lertanantawong B., Surareungchai W. (2016) Non-protein coding RNA-based genosensor with quantum dots as electrochemical labels for attomolar detection of multiple pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* **77**:805–811.
- Viswanathan V.K., Hodges K., Hecht G. (2009) Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nature Reviews Microbiology* **7**:110–119.
- Vouga M., Greub G. (2016) Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. *Clinical Microbiology and Infection* **22**:12–21.
- Waldor M.K., RayChaudhuri D. (2000) Treasure trove for cholera research. *Nature* **406**:469–470.
- Wang R. (2004) Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing. *Biosensors and Bioelectronics* **20**:967–974.
- Wang Z., Hervey W.J., Kim S., Lin B., Vora G.J. (2015) Complete Genome Sequence of the Bioluminescent Marine Bacterium *Vibrio harveyi* ATCC 33843 (392 [MAV]). *Genome Announcements* **3**:e01493-14.
- Wang H., Li Y., Slavik M. (2007) Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using quantum dots and nanobeads-based optical biosensor. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* **15**:67–76.
- Wang C., Madiyar F., Yu C., Li J. (2017) Detection of extremely low concentration waterborne pathogen using a multiplexing self-referencing SERS microfluidic biosensor. *Journal of Biological Engineering* **14**:11–9.
- Wang G., Shuai L., Li Y., Lin W., Zhao X., Duan D. (2008) Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on hole-rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology* **20**:403–409.
- Wang Y., Ye Z., Si C., Ying Y. (2013) Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. *Food Chemistry* **136**:1303–1308.
- Wang Y., Ye Z., Ying Y. (2012) New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors* **12**:3449–3471.
- Weis K.E., Hammond R.M., Hutchinson R., Blackmore C.G.M. (2011) *Vibrio* illness in Florida, 1998–2007. *Epidemiology and Infection* **139**:591–598.

- West P.A. (1989) The human pathogenic vibrios—a public health update with environmental perspectives. *Epidemiology & Infection* **103**:1–34.
- WHO (2003) World Health Organization, Emerging Issues in Water and Infectious Disease. WHO Library Cataloguing in Publication Data ; Geneva, Switzerland.
- Wijaya E., Lenaerts C., Maricot S., Hastanin J., Habraken S., Viltot J.-P., Boukherroub R., Szunerits S. (2011) Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **15**:208–224.
- Wong H. (2004) Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiology Letters* **233**:269–275.
- Wong H. C., Wang P. (2004) Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology* **96**:359–366.
- Worden A.Z., Seidel M., Smriga S., Wick A., Malfatti F., Bartlett D., Azam F. (2006) Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environmental Microbiology* **8**:21–29.
- Wright A.C., Powell J.L., Kaper J.B., Morris J.G. (2001) Identification of a Group 1-Like Capsular Polysaccharide Operon for *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* **69**:6893–6901.
- Wu X., Xu C., Tripp R.A., Huang Y., Zhao Y. (2013) Detection and differentiation of foodborne pathogenic bacteria in mung bean sprouts using field deployable label-free SERS devices. *The Analyst* **138**:3005–3012.
- Xu S.L., Qiu C.G., Zhou W., Wang D.L., Jia C.Y., Wang C.L. (2013) Pathological analysis of hemolymphs of *Charybdis japonica* infected with *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* **35**:1577–1584.
- Xia H., Wang F., Huang Q., Huang J., Chen M., Wang J., Yao C., Chen Q., Cai G., Fu W. (2008) Detection of *Staphylococcus epidermidis* by a Quartz Crystal Microbalance Nucleic Acid Biosensor Array Using Au Nanoparticle Signal Amplification. *Sensors* **8**:6453–6470.
- Yang K., Zhang C.Y. (2010) Improved Sensitivity for the Electrochemical Biosensor with an Adjunct Probe. *Analytical Chemistry* **82**:9500–9505.
- Yildiz F.H., Visick K.L. (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology* **17**:109–118.
- Yoo S.M., Lee S.Y. (2016) Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. *Trends in Biotechnology* **34**:7–25.
- Yugender Goud K., Catanante G., Hayat A., M. S., Vengatajalabathy Gobi K., Marty J.L. (2016) Disposable and portable electrochemical aptasensor for label free detection of aflatoxin B1 in alcoholic beverages. *Sensors and Actuators B: Chemical* **235**:466–473.
- Zeigler D.R. (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1893–1900.
- Zelada-Guillén G. A., Bhosale S. V., Riu J., Rius F. X. (2010) Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. *Analytical Chemistry* **82**:22.

- Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. (2013) Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology* **47**:7137–7146.
- Zhang X.-J., Qin G.-M., Bing X.-W., Yan B.-L., Liang L.-G. (2011) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus*, a pathogen of the cultured tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fish Diseases* **34**:57–64.
- Zhang D., Yan Y., Li Q., Yu T., Cheng W., Wang L., Ju H., Ding S. (2012) Label-free and high-sensitive detection of *Salmonella* using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor. *Journal of Biotechnology* **160**:123–128.
- Zhou S., Hou Z., Li N., Qin Q. (2007) Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *Journal of Applied Microbiology* **103**:1897–1906.

Résumé

Les épisodes de mortalité massive de l'huître creuse *Crassostreae gigas* observés sur les côtes françaises depuis 2008 ont été associés à certaines espèces appartenant au genre bactérien *Vibrio*. Ces mortalités, particulièrement intenses et rapides au cœur des lagunes méditerranéennes, atteignent 80 à 100% de la production ostréicole remettant ainsi en cause la pérennité de cette activité. Une surveillance environnementale de ces bactéries apparaît donc essentielle et nécessite la mise au point de méthodes d'analyse innovantes, alternatives aux techniques couramment employées, afin de permettre un suivi rapide et en temps réel des *Vibrio* dans les milieux aquatiques côtiers.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de concevoir des outils analytiques de type génocapteurs pour la détection et la quantification des *Vibrio* dans les écosystèmes aquatiques. Dans un premier temps, un système basé sur un format d'hybridation « sandwich » reposant sur l'intercalation des acides nucléiques cibles entre une sonde capture immobilisée et une sonde signal marquée, couplé à une détection optique, a été élaboré. Après optimisation des conditions expérimentales, le test développé s'est avéré très sensible avec une limite de détection de $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ d'acides nucléiques, ainsi qu'hautelement spécifique du genre *Vibrio*. La méthode a ensuite été appliquée avec succès à la détection des *Vibrio* dans des échantillons environnementaux, collectés dans la lagune de Salses-Leucate. Un second format d'hybridation, basé sur la compétition entre les acides nucléiques cibles et la sonde capture pour la sonde signal, a ensuite été envisagé en utilisant aussi bien une transduction optique qu'électrochimique.

En parallèle, des méthodes de PCR quantitative en temps réel ont été mises au point afin de servir de références pour la validation des génocapteurs.

Mots clés : surveillance environnementale ; écosystèmes aquatiques ; *Vibrio* spp. ; génocapteurs ; PCR quantitative en temps réel.

Abstract

Mass mortality events affecting the Pacific oyster *Crassostreae gigas* on French coasts since 2008 have been associated to some *Vibrio* species. These mortalities, particularly severe and sudden in the mediterranean lagoons, can reach 80 to 100% of the oyster production threatening the sustainability of this activity. An environmental monitoring of these bacteria appears essential and, for this purpose, innovative analytical methods have to be developed as alternative to classical techniques, in order to allow the rapid and in real time monitoring of *Vibrio* in the coastal aquatic environments.

In this context, the objective of the thesis was to design genosensors as analytical tools for *Vibrio* detection and quantification in aquatic ecosystems. In a first step, a system based on a « sandwich » hybridization format, in which nucleic acid targets were bound between an immobilized capture probe and a labeled signal probe, coupled with an optical detection method, was developed. After experimental condition optimization, the test showed high sensitivity with a limit of detection of $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of nucleic acids and was highly specific to *Vibrio* spp. The method was then successfully applied to *Vibrio* detection in environmental samples collected in Salses-Leucate lagoon. A second hybridization format, based on a competition between the targeted nucleic acids and the capture probe for the signal probe has been considered using both optical and electrochemical transductions.

Concurrently with the development of genosensors, quantitative real-time PCR have been designed as reference methods.

Keywords : environmental monitoring ; aquatic ecosystems ; *Vibrio* spp. ; genosensors ; quantitative real-time PCR.