

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 43078 A1** (51) Cl. internationale : **G01N 21/763**

(43) Date de publication :
28.02.2020

(21) N° Dépôt :
43078

(22) Date de Dépôt :
06.08.2018

(71) Demandeur(s) :
UNIVERSITE CHOUAÏB DOUKKALI, Bv.JABRANE KHALIL JABRANE. BP: 299 (MA)

(72) Inventeur(s) :
BLAGHEN MOHAMED ; ABAKAR ABDELHAMID ABDELLAH

(74) Mandataire :
SAHABI MOHAMED

(54) Titre : **BIOLUMINESCENCE DE VIBRIO FISCHERI : UNE NOUVELLE APPLICATION POUR LA QUANTIFICATION DE PSP**

(57) Abrégé : La présente invention concerne, l'utilisation de la bioluminescence de la souche bactérienne *Vibrio fischeri* pour la quantification des PSP (Paralytic shellfish Poisoning) tel que la saxitoxine dans la chair des animaux marins et spécialement les bivalves, concentrateur de ses toxines. Cette invention peu coûteuse se caractérise par sa rapidité, sa facilité d'utilisation, sa fiabilité, sa sensibilité et sa reproductibilité.

Abrégé

La présente invention concerne, l'utilisation de la bioluminescence de la souche bactérienne *Vibrio fischeri* pour la quantification les PSP (Paralytic shellfish Poisoning) tel que la saxitoxine dans la chair des animaux marins et spécialement les bivalves, concentrateur de ses toxines. Cette invention peu coûteuse se caractérise par sa rapidité, sa facilité d'utilisation, sa fiabilité, sa sensibilité et sa reproductibilité.

Titre de l'invention :**Bioluminescence de *Vibrio fischeri* : Une nouvelle application pour la quantification de PSP****Description**

Domaine : Biotechnologie.

Certaines espèces de dinoflagellés comme l'*Alexandrium*, le *Gymnodinium* et le *Pyrodinium* produisent des Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). Ce sont des neurotoxines très nocives, qui passent par la chaîne alimentaire marine à travers les organismes vecteurs qui se nourrissent et accumulent les dinoflagellés producteurs de PSP. Parmi les PSP on a les Saxitoxines (STX), ce sont des biotoxines aquatiques, neurotoxiques les plus sévères, qui sont la cause d'un très grand nombre de cas d'empoisonnement chez l'homme.

Comme les PSP sont omniprésents le long des côtes, qui sont nuisibles à la santé humaine et à l'industrie de la pêche, plusieurs pays ont décidé de s'assurer de la salubrité des coquillages destinées à la consommation humaine, qui ne devrait pas dépasser le seuil autorisé de PSP chez le coquillage, qui est de 800 mg/ kg de chair de coquillage.

Les méthodes officielles utilisées pour surveiller les PSP sont le test bioessai sur souris et les techniques physico-chimiques. Cependant, ces méthodes ont certaines limites, soit qu'elle présente une faible sensibilité et reproductibilité et l'indésirabilité pour des raisons éthiques comme le cas du test souris. Cette limitation a emmené à la recherche de techniques physico-chimiques alternatives pour la surveillance des PSP, tels que HPLC-FLD, LC-MS et (HILIC) LC-MS/MS. Toutes fois, ces techniques très coûteuses, nécessitent un appareillage et des opérateurs bien formés pour leur fonctionnement et consomment du temps en particulier lors d'analyse d'une grande quantité d'échantillons.

Par conséquent, il nous a paru nécessaire de mettre au point une méthode rapide, facile, sensible et peu coûteuse pour surveiller les PSP chez le coquillage. Cette invention qui repose sur l'inhibition de la bioluminescence de *vibrio fischeri* par les PSP a pour objet d'optimiser l'applicabilité et la performance de la bioluminescence de cette souche bactérienne (*V. fischeri*) pour la quantification des PSP dans le coquillage destiné à la consommation humaine. Ainsi, selon la littérature scientifique, cette méthode de bioluminescence utilisant *Vibrio fischeri* n'a jamais été utilisée pour la quantification des PSP chez le coquillage.

En premier lieu, dans le souci d'optimiser cette méthode, nous avons optimisé le temps d'émission de la bioluminescence de la bactérie *V. fischeri* souche NRRL-B-11177, en cultivant la bactérie dans le milieu LBS modifié, et en utilisant l'appareil Luminoskan Ascent Luminometer (LAL) Thermo. L'inhibition de la bioluminescence causée par les PSP, est déterminée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ light inhibition} = 100 - 100 \times (IT15 / KF \times ITO)$$

$$KF = IC15/IC0$$

L'extraction des PSP à partir des coques contaminés a été effectuée conformément au protocole précédemment publié en 2010 par CK Wong *et al.*, des coquillages conservés à -20°C , après leur collecté de Kabila, Corniche Martil, and Oued Laou, le long de la côte méditerranéenne (Fig. 1) en Mars-2015. Pour le contrôle nous avons utilisé le standard de STX ($66,3\ \mu\text{M}$) qui a servi d'établir la courbe d'étalonnage, représentant la concentration de STX en fonction de la bioluminescence.

La quantification des PSP a été effectuée selon le protocole suivant :

- Une série des dilutions des PSP extrait de la coque a été préparée dans 2% de NaCl (pH 3,5) a été utilisée comme contrôle et comme diluant.
- Avant la mesure de toxicité, les différentes dilutions des PSP ont été incubées à 25°C pendant 30 min.
- Culture de la bactérie *V. fischeri* à 25°C avec agitation (250 rpm/min) et aération (600 ml/min), pendant 22 h.
- On prélève 0,1 ml de chaque dilution de PSP qu'on mis dans les puits de microplaque, au quel on ajout automatiquement 0.1 ml de la suspension bactérienne.
- Puis, on mesure la bioluminescence de la solution.
- Le standard STX a été analysé selon le même protocole.

Les expériences ont été répétées plusieurs fois pour s'assurer de la reproductibilité de la méthode.

La Bioluminescences des différents extrais en fonction de la dilution a été effectuée .La bioluminescence croit avec le facteur de dilution et suit une allure rectiligne(Fig.2).

Pour comparer notre méthode aux méthodes existantes utilisées pour la quantification, les PSP ont été analysés selon La méthode de bioessai sur souris selon la procédure d'AOAC, et par LC-MS conformément au protocole précédemment publié en 2005 par Staack *et al.*

Tous les échantillons ont montré une toxicité chez la souris (Tableau 1), l'échantillon le plus toxique était celui d'Oued Laou et le moins toxique était celui de Kabila.

L'analyse par LC-MS, a montré que l'échantillon le plus concentré en STX était celui de Corniche Martil ($2.77\ \mu\text{M}$), suivit de Kabila ($1.31\ \mu\text{M}$) et Oued Laou ($0.98\ \mu\text{M}$) (Tableau 1),

Les différents échantillons et le standard (la saxotoxine) ont été analysés par la technique de la bioluminescence.

Les résultats montrent que la courbe représentant l'intensité de Bioluminescences en fonction de la concentration en saxitoxine est une droite avec un coefficient de corrélation très élevé $r^2 = 0.9975$.(fig.3)

Les analyses par bioluminescence montrent que les coques de la Corniche Martil était les plus toxiques, avec une valeur de $2.26\ \mu\text{M}$. Suivit de Kabila ($1.56\ \mu\text{M}$) et Oued Laou ($1.1\ \mu\text{M}$) (Tableau 1).

Etant donné que l'extraction est effectuée dans un milieu acide (pH 3.5), nous avons testé la sensibilité de la bactérie en vers différentes gammes de pH. Les pH 1, pH 14 et pH 13 ont montré une inhibition totale de la Bioluminescence de la bactérie, et que le pH 2 inhibe la lumière après 15 min d'incubation. Cependant, les PH entre 3-12 n'ont pas inhibé la lumière (Fig. 4).

La comparaison entre les trois techniques montre que les valeurs d'analyses obtenus la technique par bioluminescence sont comparables à celles obtenus par LC/MS (Fig.5)

Les résultats montrent qu'il y avait une différence significative entre les résultats obtenus par la bioessai sur souris et LC-MS, avec un coefficient de corrélation était très faible, $r = 0.11$ (Fig. 6). Par contre, les résultats obtenus par la technique de la bioluminescence sont significativement comparables à ceux obtenus par LC-MS, avec un bon coefficient de corrélation, $r = 0.97$ (Fig. 7).

Etant donné que la méthode de bioessai sur souris et les techniques physico-chimiques peuvent montrer quelques limites, la technique de la bioluminescence qui est rapide, facile à faire, sensible et peu coûteuse, en plus de sa forte corrélation avec LC-MS ($r = 0.97$), elle peut être utilisée comme une technique alternative pour la quantification de PSP.

Figures :

Tableau 1 : les valeurs de STX obtenu en utilisant la bioessai sur souris, LC-MS et la Bioluminescence

Figure 1: Sites d'échantillonnage

Figure 2 : Mesures de luminescence de *V. fischeri* exposées à des dilutions de PSP d'Oued Laou, Kabila et Corniche Martil.

Figure 3 : Courbe de standard de Saxitoxin obtenue par la technique de la Bioluminescence

Figure 4 : Mesures de la luminescence de *V. fischeri* exposées à des solutions de pH 1-14

Figure 5 : Comparaison des concentrations en PSP trouvées par les trois méthodes (bioessai sur souris, LC/MS et bioluminescence)

Figure 6 : Corrélation entre LC-MS et la Bioessai sur souris, pour l'analyse de la PSP chez le coquillage (Nombre d'échantillons comparés = 3)

Figure 7 : Corrélation entre LC-MS et la Bioluminescence, pour l'analyse de la PSP chez le coquillage (Nombre d'échantillons comparés = 3)

Revendications

On revendique la quantification des PSP (paralytic Shelffish Poisoning) par bioluminescence et *Vibrio fischeri*.

Figures

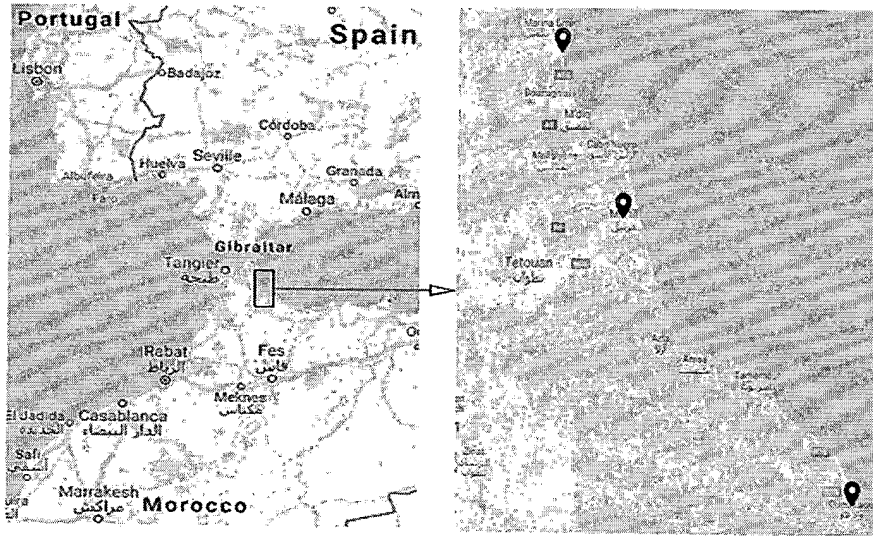


Figure 1

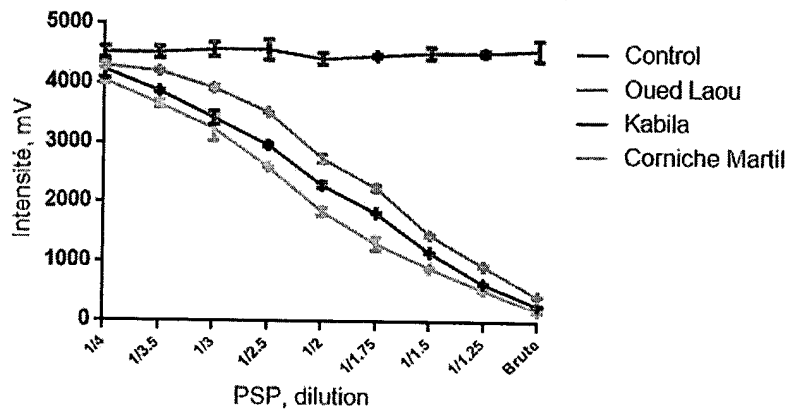


Figure 2

PSP (μM)	Bioessai souris	LC-MS	Bioluminescence
Corniche Martil	$11.20 \pm 1,20$	2.77	$2.26 \pm 0,01$
Kabila	$06.30 \pm 0,70$	1.31	$1.56 \pm 0,02$
Oued Laou	$12.80 \pm 1,30$	0.98	$1.1 \pm 0,01$

Tableau 1



Figure 3

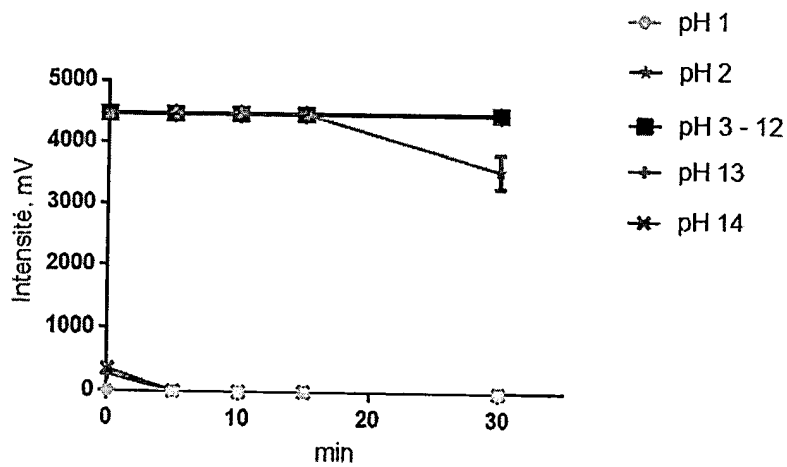


Figure 4

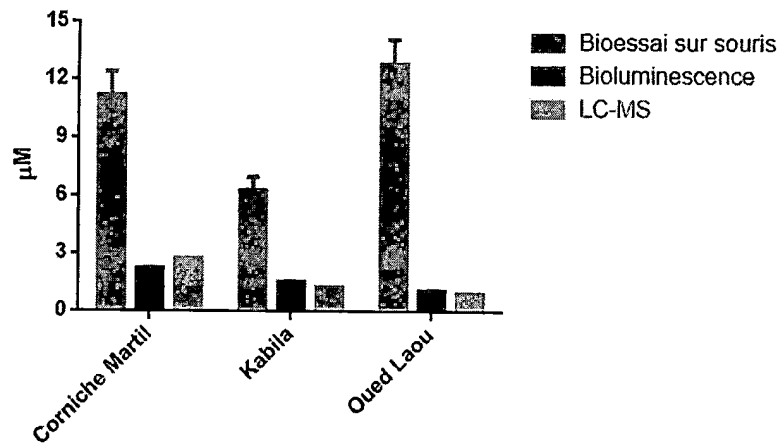


Figure 5

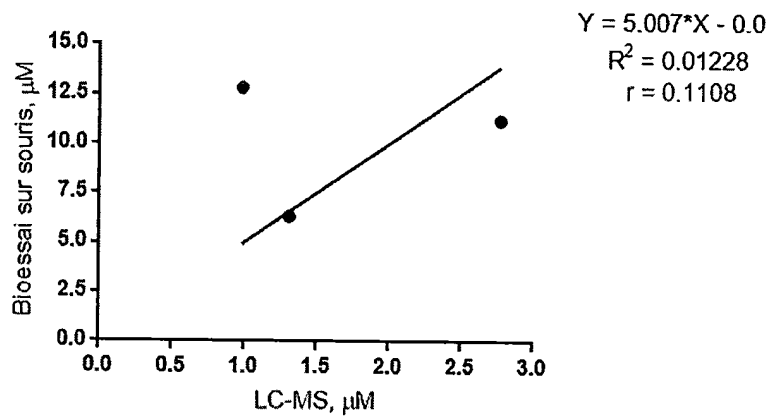


Figure 6

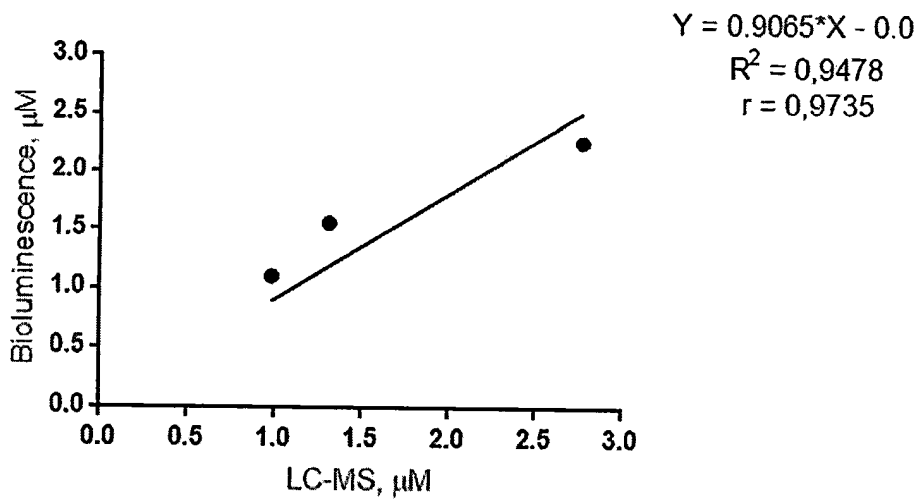


Figure 7

ROYAUME DU MAROC
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية
المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée
par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 43078	Date de dépôt : 06/08/2018
Déposant : UNIVERSITE CHOUAÏB DOUKKALI	
Intitulé de l'invention : BIOLUMINESCENCE DE VIBRIO FISCHERI : UNE NOUVELLE APPLICATION POUR LA QUANTIFICATION DE PSP	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport <input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention <input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité <input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
Examineur: LAHCHIMI Fatima Zahra	Date d'établissement du rapport : 04/02/2019
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

Partie 1 : Considérations générales**Cadre 1 : base du présent rapport**

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
3 Pages
- Revendications
1
- Planches de dessin
3 Pages

Partie 2 : Rapport de recherche

Classement de l'objet de la demande :

CIB: G01N21/763

Plateformes et bases de données électroniques de recherche :

EPOQUENET, WPI, ScienceDirect

Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
X	Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins; A. R. Humpage et al; Analytical and Bioanalytical Chemistry; 26/01/2010 DOI: 10.1007/s00216-010-3459-4	1
X	Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review; Mazhar Abbas et al; Science of the Total Environment; 19/02/2018 DOI:10.1016/j.envint.2005.08.022	1

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 -« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 -« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 -« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
 -« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 4 : Remarques de clarté**

La revendication de la présente invention doit être rédigée en deux parties, la première consistant en un préambule indiquant la désignation de l'objet de l'invention et les caractéristiques techniques qui sont nécessaires à la définition des éléments revendiqués mais qui, combinées entre elles, font partie de l'état de la technique, et la seconde (la partie caractérisante), précédée des expressions «caractérisé en» ou «caractérisé par», ou «l'amélioration comprend» ou d'une formule analogue, consistant en une indication des caractéristiques techniques qui, combinées aux caractéristiques énoncées dans la première partie, sont celles pour lesquelles la protection est demandée.

Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté	Revendications 1 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications aucune Revendications 1	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure :

D1 : A comparative study for PSP toxins quantification by using MBA and HPLC official methods in shellfish

D2 : Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review

1. Nouveauté

Aucun des documents cités ci-dessus ne divulgue l'ensemble des caractéristiques techniques de la présente invention, à savoir l'utilisation de bioluminescence de la bactérie *V.fischeri* souche NRRL-B-11177 pour la quantification des Paralytic Shellfish Poisoning dans le coquillage destiné à la consommation humaine. Par conséquent, l'objet de la présente invention est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet de la présente invention, il décrit une étude comparative pour la quantification des toxines PSP en utilisant les méthodes officielles MBA et HPLC dans les mollusques et crustacés.

L'objet de la présente invention diffère du document D1 par la technique utilisé pour la quantification des PSP.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre est considéré comme la fourniture d'une méthode alternative pour la quantification des PSP dans le coquillage destiné à la consommation humaine.

La solution proposée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive pour les raisons suivantes :

L'application de la propriété bioluminescence de *Vibrio fischeri* pour l'évaluation de la toxicité de plusieurs toxines est déjà connu dans l'état de l'art en raison de nombreux avantages (la durée de test, la sensibilité, la rentabilité et la facilité d'utilisation), notamment dans le document D2 qui divulgue un bio-essai d'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri* pour la surveillance de la toxicité dans différents échantillons (composés organiques et inorganiques, métaux, eaux usées, eaux de rivière, boues d'épuration, herbicides, eaux usées traitées, etc.).

Ainsi, En se basant sur ces données divulguées dans les documents de l'art antérieur et sur les expérimentations de routine, l'homme de métier confronter au problème cité peut procéder à la fourniture d'une méthode alternative pour la quantification des PSP sans faire preuve d'éprit inventif.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 n'implique pas une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.