

(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 43078 B2** (51) Cl. internationale : **G01N 21/76**
(43) Date de publication : **30.06.2021**

-
- (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 :

$$\% \text{ light inhibition} = 100 - 100 \times (IT15 / KF \times IT0)$$

$$KF = IC15/IC0$$

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)
- Une solution de 2% 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)

Figure7 : Corrélation entre LC-MS et la Bioluminescence, pour l'analyse de la PSP chez le coquillage (Nombre d'échantillons comparés = 3)

REVENDECATIONS

1. Procédé destiné à détecter et à quantifier des toxines paralytiques de mollusques qui inhibent la bioluminescence de la bactérie *V. fischeri*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes consistant à :

- Vivication de la bactérie *V. fischeri*
- Culture de vibrio fischri
- Quantification de PSP dans les bivalves par MB
- Détermination de la courbe standard

2. Procédés selon la revendication 1 caractérisé en ce que les étapes de vivication comprend :

- Stabilisation de la bactérie luminescente lyophilisée *V. fischeri* à 4° C pendant 30 min. suivi de son ensemencement dans le milieu LBS modifié (10 g de bouillon nutritif, 5 g d'extrait de levure, 2% de NaCl, 50 ml de tampon Tris 1 M, pH 7,5 ± 0,02, température à 25° C, aération (600 ml/min), agitation (250 rpm) et incubation à 25° C pendant 24 h. (culture A : (DO_{600 nm} = 1.6 à 1,8))
- Ensemencement de 0,05 ml de cette culture A (DO_{600 nm} = 1.6 à 1,8) dans 5 ml de LBS modifié frais pendant 2 h à 25° C (culture B).

3. Procédés selon la revendication 1 caractérisé en ce que les étapes de culture comprend :

- Incubation de la bactérie *V. fischeri* dans la plaque de culture au sein de l'instrument de Bioluminescence
- Addition automatique de 0,1 ml de la suspension bactérienne ((culture B, DO_{600 nm} = 0,05)) dans les puits de la plaque au sein de la chambre de l'instrument de Bioluminescence contenant 0,1 ml de 2% NaCl à pH 7,5 ± 0,02.
- Après 24 à 30 heures de culture addition de 0,1 ml d'une série de dilution (1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4) de chaque échantillon de PSP de mollusque à 2% NaCl (pH 3,5) ou de la saxitoxine
- Agitation de la plaque au sein de l'instrument pendant 10 s. et mesure et enregistrement de la bioluminescence.

- Incubation de la bactérie au sein d'un bain marie avec agitation et aération.

4. Procédés selon la revendication 1 caractérisé en ce que les étapes de quantification comprend :

Les échantillons de PSP à quantifier sont dilués avec 2% NaCl à pH 3,5 comme suit :

1/ 1,25 - 1/ 1,5 - 1/ 1,75 - 1/ 2 - 1/ 2,5 - 1/ 3 - 1/ 3,5 - 1/ 4

- Introduction de 0,1 ml de chaque dilution dans différents puits en double, et compléter automatiquement avec 0,1 ml de la suspension bactérienne A ($DO_{600nm} = 1,4$ à $1,8$), temps d'incubation de 18 à 22 heures.
- Mesure et enregistrement de la bioluminescence après l'agitation automatique de la microplaque. Le signal de la lumière est mesuré en double à $25^{\circ} C$ juste après le mélange

Procédure de quantification de la PSP dans les bivalves:

- ✓ Revivication et stabilisation de la bactérie luminescente après incubation à $25^{\circ} C$, agitation (250 rpm) et aération (600 ml/ min) pendant 22 h. ($DO_{600nm} = 1,6$ à $1,8$)
- ✓ Etablissement d'une série de dilution (1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4) de chaque échantillon de PSP de mollusque à 2% NaCl (pH 3,5).
- ✓ Incubation des dilutions des extraits de mollusque contaminés par PSP à $25^{\circ} C$ pendant 30 min.
- ✓ Introduction de 0,1 ml de chaque dilution dans différents puits en double
- ✓ Addition automatiquement de 0,1 ml de la suspension bactérienne ($DO_{600nm} = 1,4$ à $1,8$), temps d'incubation de 18 à 22 heures).
- ✓ Mesure automatique et enregistrement de la bioluminescence après le mélange.
- ✓ Détermination de la quantité de toxine présente dans les extraits de mollusque selon les diminutions de bioluminescences détectées et un standard fondé sur les saxitoxines.

5. Procédés selon la revendication 1 caractérisé en ce que les étapes de la courbe standard comprend :

Mesure et enregistrement de l'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio Fischeri* par la Saxitoxine, le standard, à différentes concentrations selon les mêmes conditions cités ci-dessus.

Figures

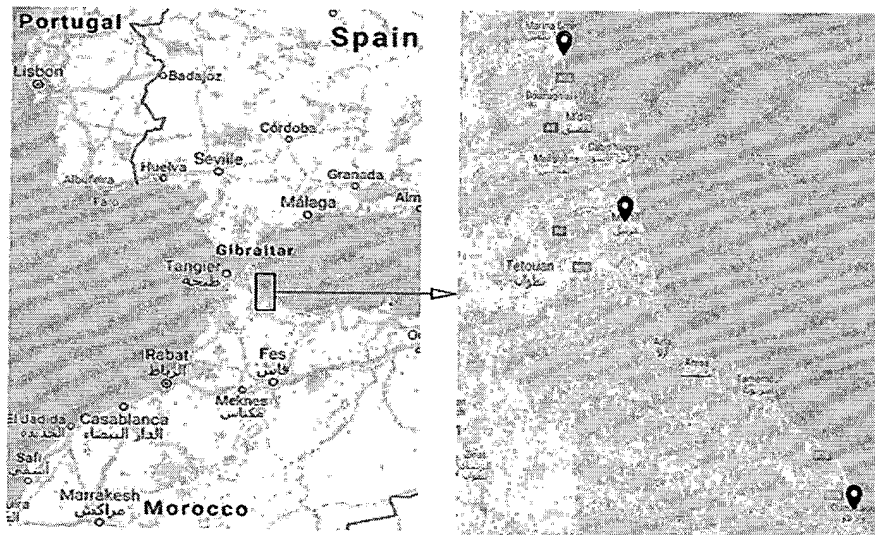


Figure 1

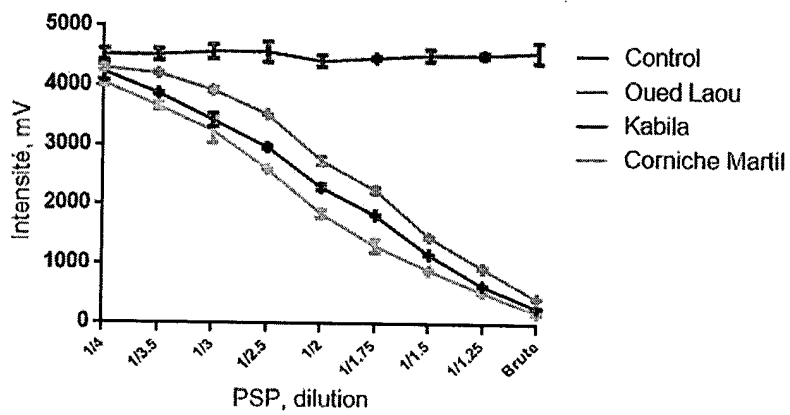


Figure 2

| 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

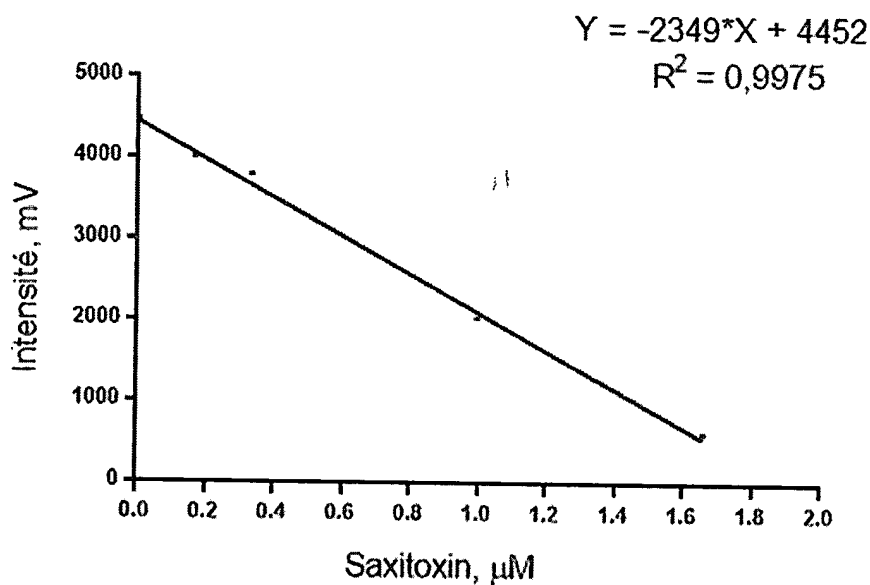


Figure 3

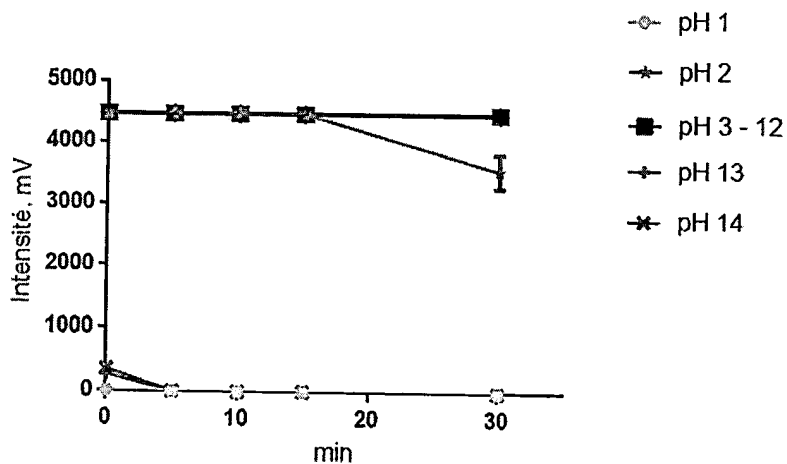


Figure 4

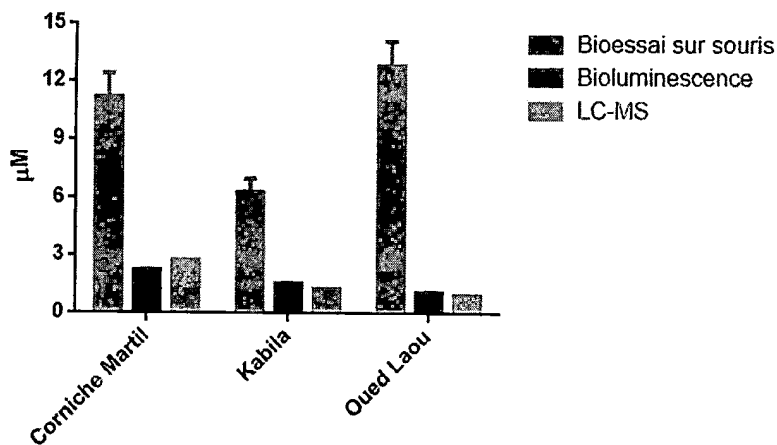


Figure 5

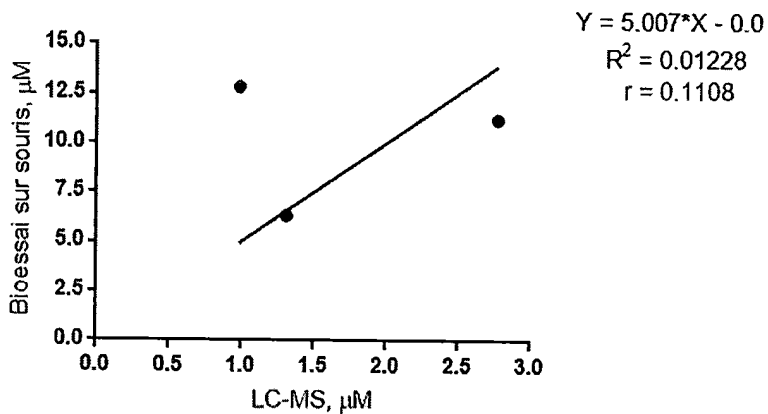


Figure 6

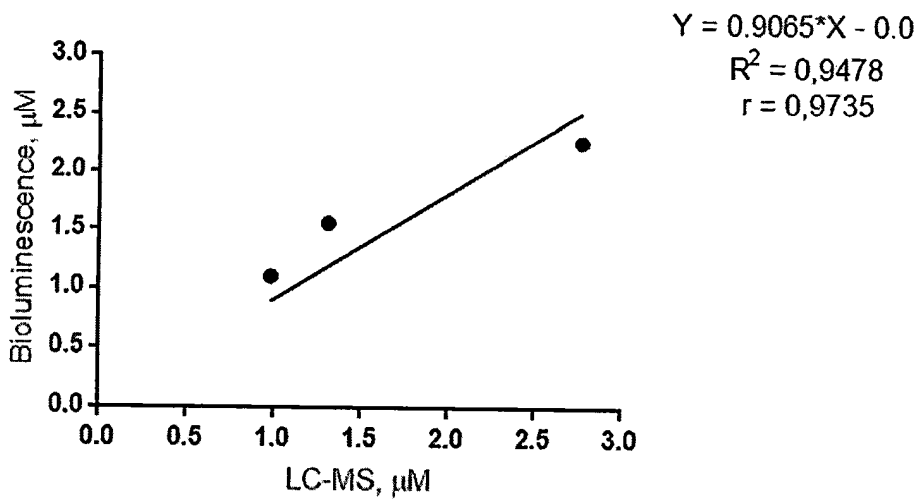


Figure 7

RAPPORT DE RECHERCHE DEFINITIF AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE

Établi conformément à l'article 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 | |
| Classement de l'objet de la demande : CIB : G01N21/76 | |
| 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 | |
| Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité | |
| <input type="checkbox"/> Cadre 3 : Remarques de clarté <input type="checkbox"/> Cadre 4 : Observations à propos de revendications modifiées qui s'étendent au-delà du contenu de la demande telle qu'initialement déposée <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 : 22/06/2021 |
| Téléphone: (+212) 5 22 58 64 14 |  |

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

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

- Demande telle qu'initialement déposée
- Demande modifiée suite à la notification du rapport de recherche préliminaire :
 - Revendications
5
- Observations à l'appui des revendications maintenues
- Observations des tiers suite à la publication de la demande
- Réponses du déposant aux observations des tiers
- Nouveaux documents constituant des antériorités
- Observations à l'encontre de la décision de rejet

Partie 2 : Opinion sur la brevetabilité**Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle**

| | | |
|--------------------------|---|------------|
| Nouveauté | Revendications 1-5 Revendications aucune | Oui Non |
| Activité inventive | Revendications 1-5 Revendications aucune | Oui Non |
| Application Industrielle | Revendications 1-5 Revendications aucune | Oui Non |

Il est fait référence aux documents suivants:

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 utilisée pour la quantification des PSP.

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

La solution proposée peut être considérée comme impliquant une activité inventive pour les raisons suivantes : L'absence d'incitation pour l'homme de métier d'utiliser le test d'inhibition de la bioluminescence (BIA) pour une quantification spécifique des PSP, et les tests comparatifs présentés par le déposés démontrent clairement que l'utilisation de cette nouvelle technique permet de résoudre le problème technique cité ci-dessus.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-5 implique 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.