

BIOSENS



Développement de biocapteurs à sondes oligonucleotidiques (ADN) pour la détection de pathogènes et d'agents de biocontrôle en temps réel



C. Dekuijper, M. Moulin, Déborah Lanterbecq

CARAH asbl / HEPH-Condorcet
Ath, Belgium

Lille, 18/04/2018



ATH

- Situé à 1h de Lille
- Haute Ecole Provinciale – Condorcet
- Centre de recherche associé: CARAH asbl
- Laboratoire de Biotechnologie et Biologie Appliquée



1. BIOSCREEN

2. BIOPROD

3. BIOPROTECT

Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

MateriaNova
MATERIALS R&D CENTRE

Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille



Université
de Lille
SCIENCES
ET TECHNOLOGIES

FREDON
Nord Pas-de-Calais
la santé des végétaux

UNIVERSITEIT
GENT

CHRU

CNRS

Univ
Lille

Fredon

Ugent

PCG

11
partenaires

Materia
Nova

CARAH

Ulg -
GxA

CSL

Multitel

pcg



Gembloux Agro-Bio Tech
Université de Liège



Multitel
INNOVATION CENTRE

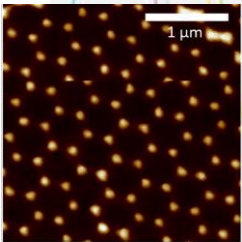
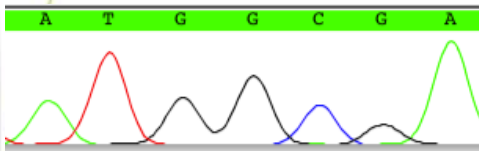
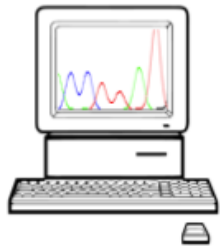


Project #4 - BIOSENS

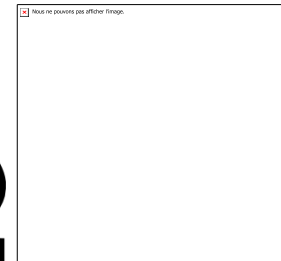
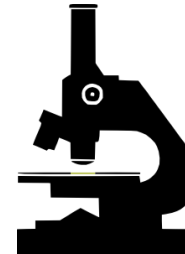
Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Intégrer des technologies de pointe

Concevoir des capteurs spécifiques et sensibles



(MICRO)
BIOLOGIE
MOLECULAIRE
&
BIOINFORMATIQUE

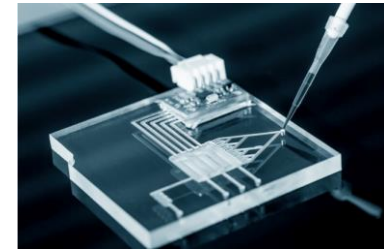


AGRONOMIE



PHYSIQUE

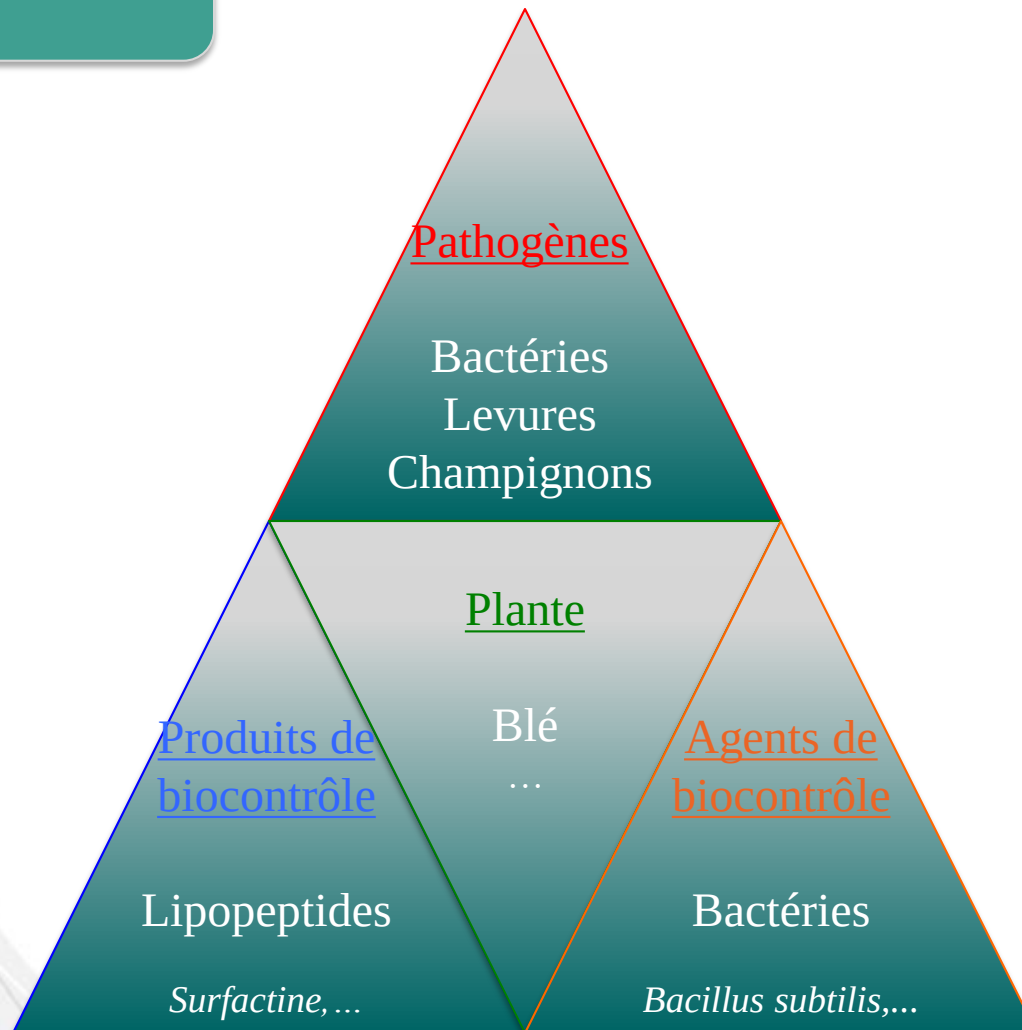
BIOCHIMIE



Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Détecter quoi ?

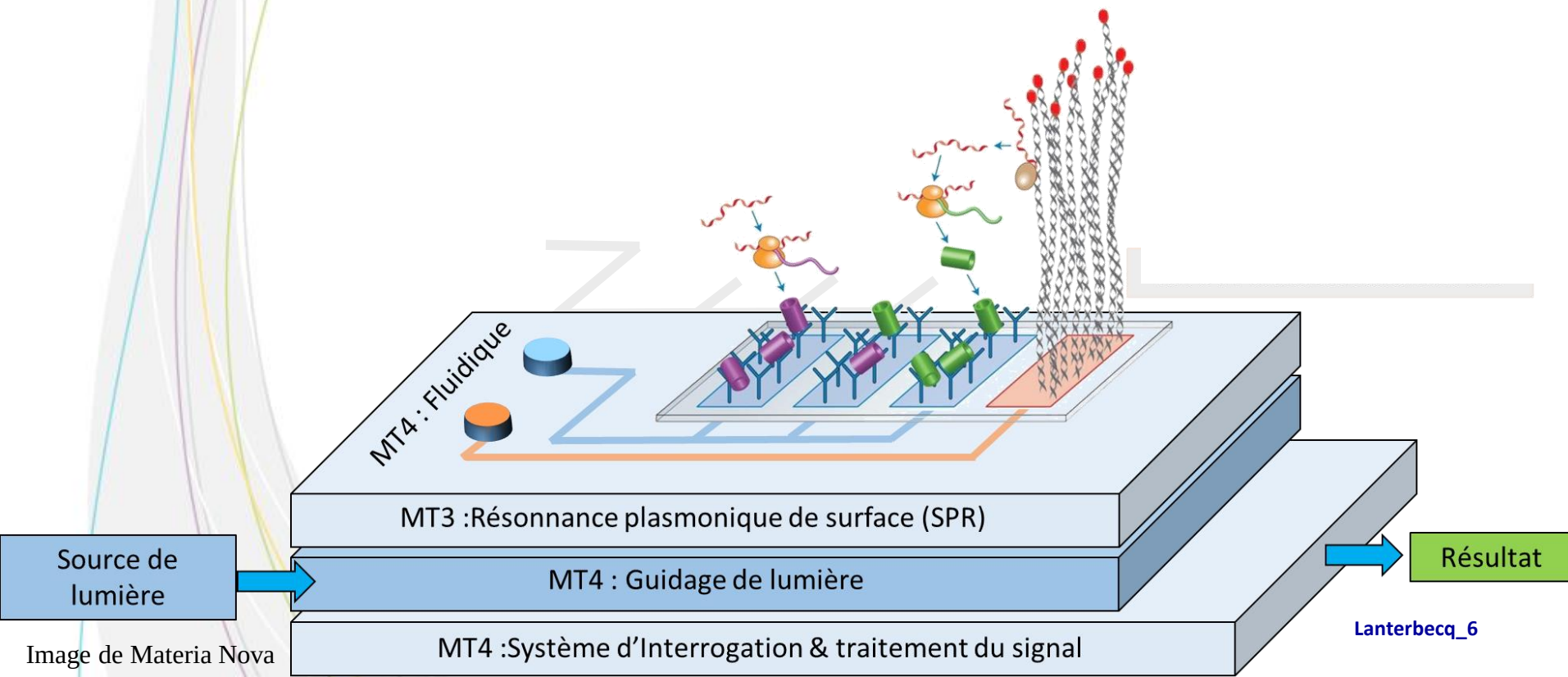


Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Comment ?

- MT 3 - Fabrication des puces détectrices (SPR)
- MT 4 - Instrumentation opto-fluidique
- MT 5 - Fonctionnalisation biologique
- MT 6 - Validation biologique (labo) et agronomique



Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Comment ?

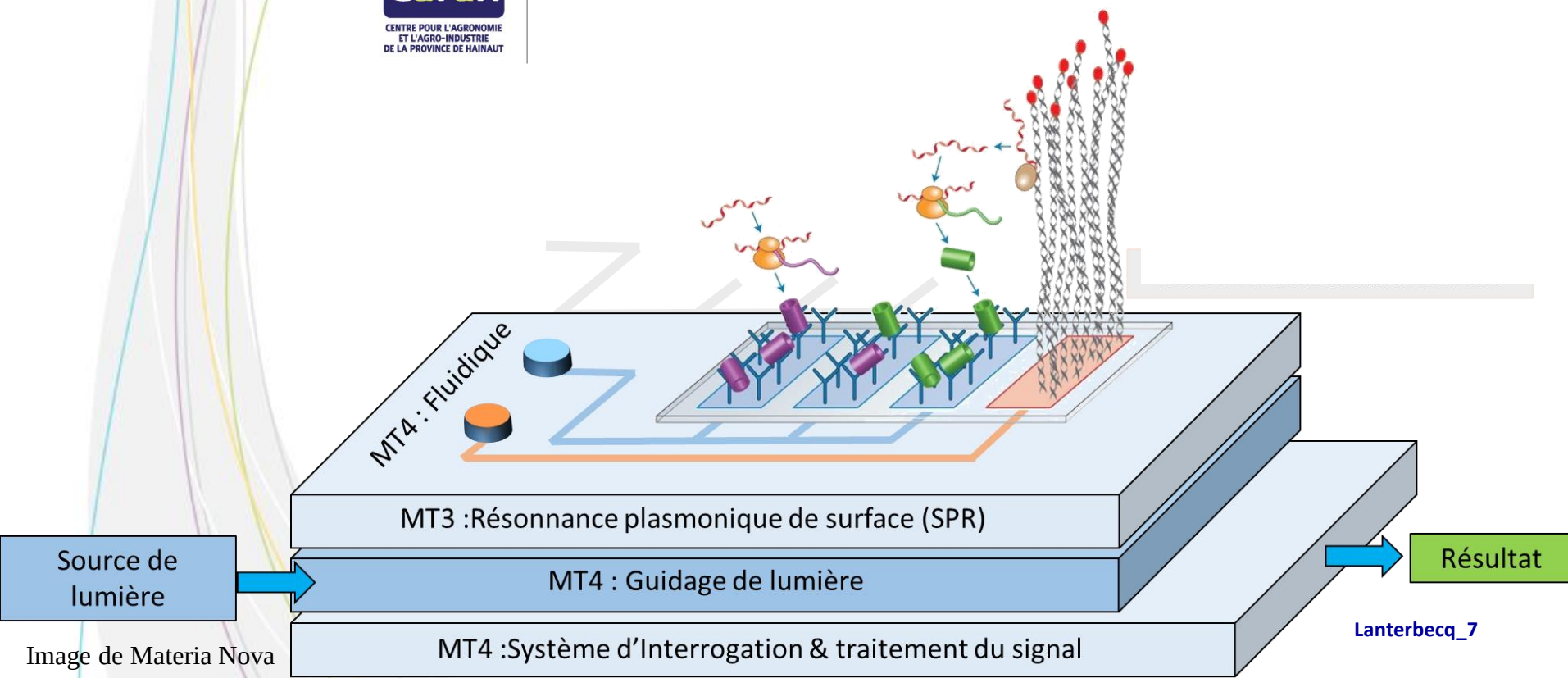


MT 3 - Fabrication des puces détectrices (SPR)

MT 4 - Instrumentation opto-fluidique

MT 5 - Fonctionnalisation biologique

MT 6 - Validation biologique (labo) et agronomique



Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Comment ?

MT5 - Fonctionnalisation biologique

Sondes
immunologiques



Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille

Sondes
nucléotidiques



CENTRE POUR L'AGRONOMIE
ET L'AGRO-INDUSTRIE
DE LA PROVINCE DE HAINAUT

Design et
production de
sondes spécifiques

peptides / protéines

DNA / RNA

MT5 : Fonctionnalisation bio

MT4 : Fluidique

MT3 : Résonance plasmonique de surface (SPR)

MT4 : Guidage de lumière

MT4 : Système d'Interrogation & traitement du signal

Source de
lumière

Résultat

Lanterbecq_8

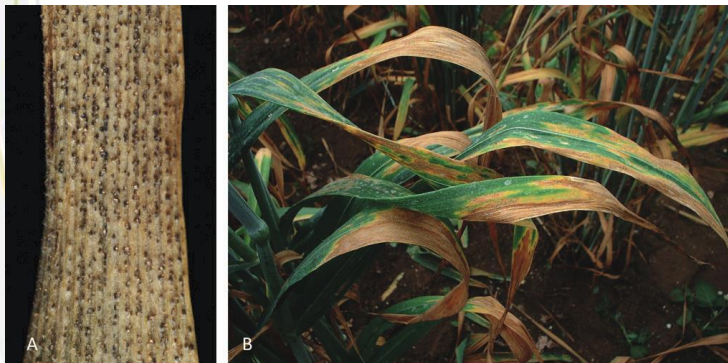
Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Par quoi
commencer ?

Design et
production de
sondes spécifiques

Pathosystème: **Blé – Agent pathogène de la septoriose** *(Zymoseptoria tritici)*



Septoria tritici blotch symptoms on leaves in artificial inoculation conditions (A) and in the field (B). (Photograph in B by L. Chartrain.)

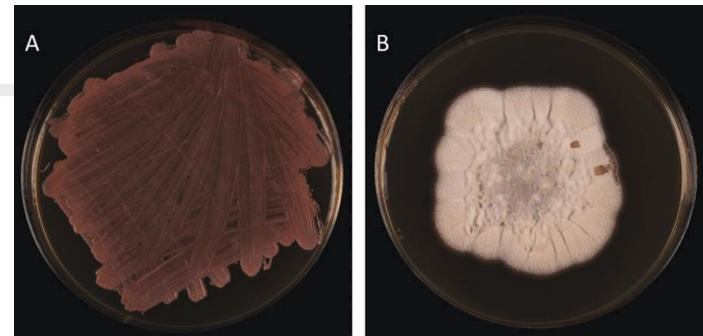


Fig. 2 Cultures of *Mycosphaerella graminicola* isolates growing as a yeast-like mass (A) and a filamentous mycelium (B).

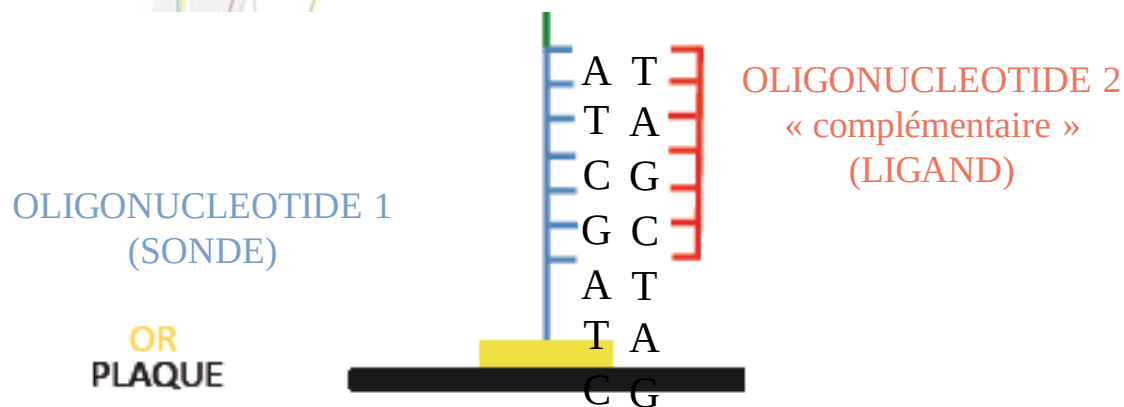
Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

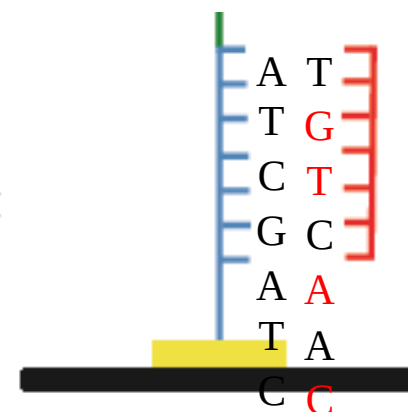
Design des sondes ADN

Pathosystème: Blé – *Zymoseptoria tritici*

Perfect match!



Mismatch!



Difficulté réside dans la sélection **de fragments « sondes »** :

- **très spécifiques** (complémentaires uniquement de l'espèce du pathogène concerné, voire même spécifique de la souche parfois, sans aucune complémentarité possible avec de l'ADN 'polluant')
- **courtes** afin de pouvoir être greffées sur la 'puce'
- **déTECTABLES** par les méthodes classiques afin de pouvoir valider le système (MT6)

Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

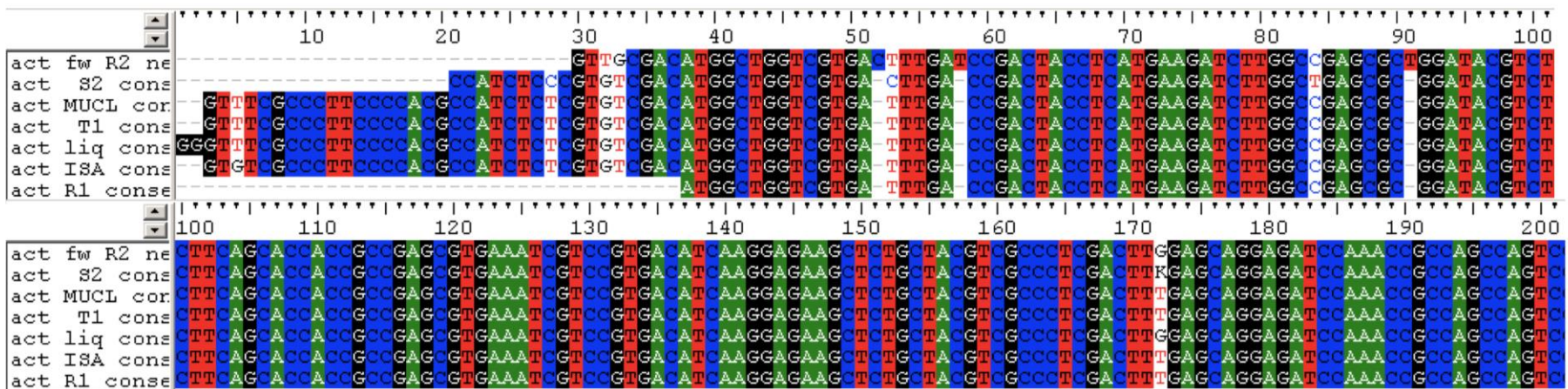
Design des sondes ADN

Pathosystème: *Blé – Zymoseptoria tritici*

- Etude bibliographique:
 - identifier des **gènes d'intérêt**
 - sélectionner des **techniques de détection et de quantification** classiques de biologie moléculaire (PCR, PCR temps réel et quantitative, ...):

PREPARATION de la VALIDATION de la puce (MT6)

- Etude bioinformatique menée sur l'alignement des séquences nucléotidiques de ces différents gènes afin de dégager des **zones suffisamment spécifiques** (sondes)



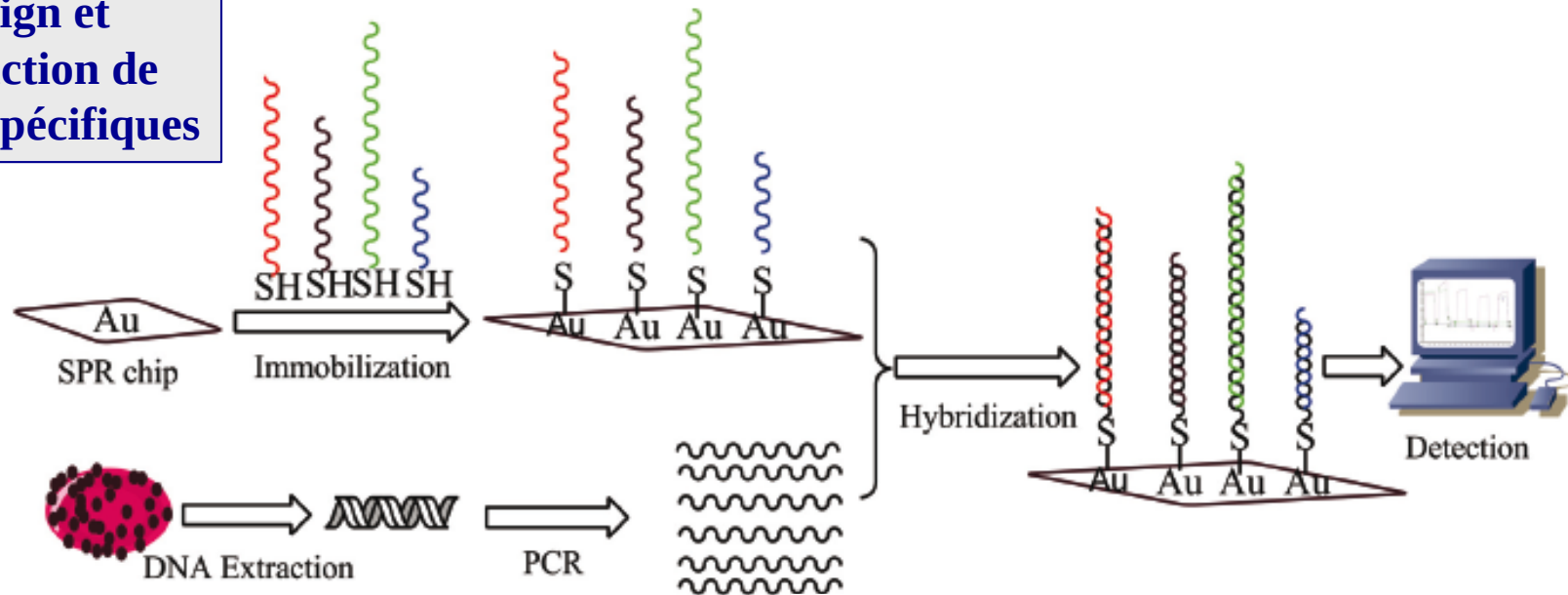
Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Greffage des sondes ADN

Design et
production de
sondes spécifiques

Pathosystème: *Blé – Zymoseptoria tritici*



Wang et al. Journal of Translational Medicine 2011, 9:85

Difficulté réside dans la sélection du **mode de greffage** adéquat sur surface d'or et de son **paramétrage** expérimental (durée de contact, température, intermédiaires chimiques,...)

Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Greffage des
sondes ADN

Design et
production de
sondes spécifiques

Pathosystème:
Blé – *Zymoseptoria tritici*



Difficulté réside dans la sélection du **mode de greffage** adéquat sur surface d'or et de son **paramétrage** expérimental (durée de contact, température, intermédiaires chimiques,...)

Validation labo (préparation)

DETECTION SPECIFIQUE

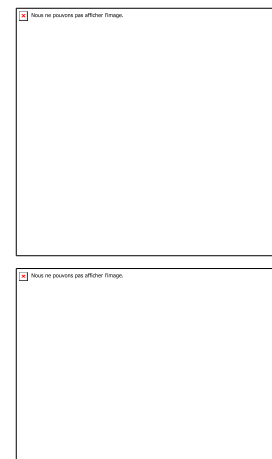
- Classic PCR
- qPCR SYBRGreen
- qPCR TaqMan
- BLAST

QUANTIFICATION

- Courbe Standard

Pathosystème: **Blé – *Zymoseptoria tritici***

ADN de référence
ADN extrait de prélèvements de
différentes natures (air, sol,
feuille, épi,...)



Project #4 - BIOSENS

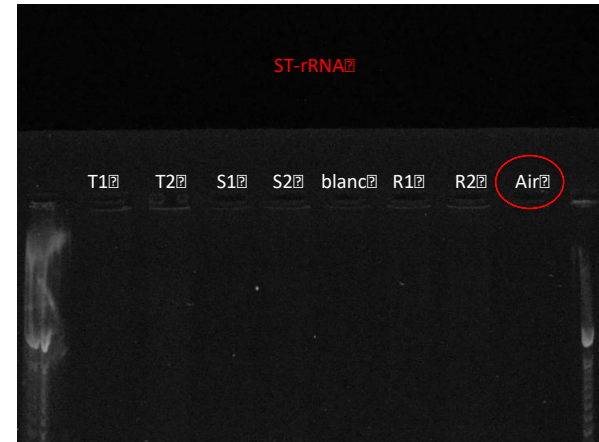
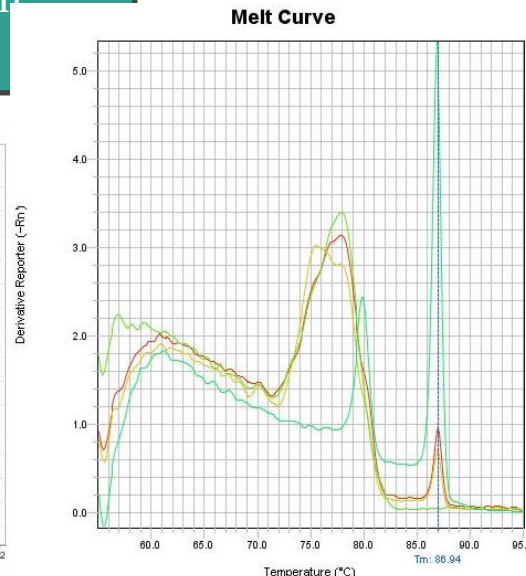
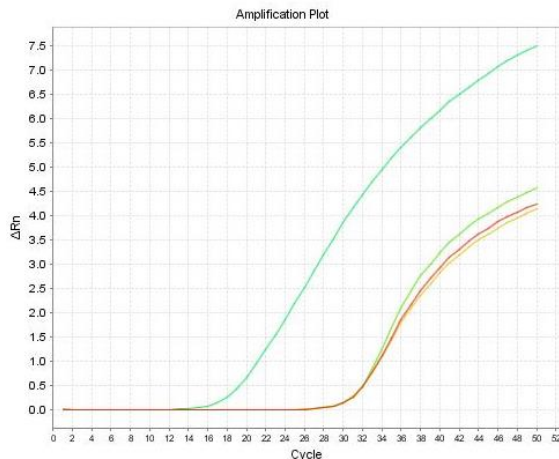
Développement de biocapteurs
Quantification / Specific detection
détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Validation labo
(préparation)

Pathosystème:
Blé – *Zymoseptoria tritici*

DETECTION SPECIFIQUE

- Classic PCR
- qPCR SYBRGreen
- qPCR TaqMan
- BLAST



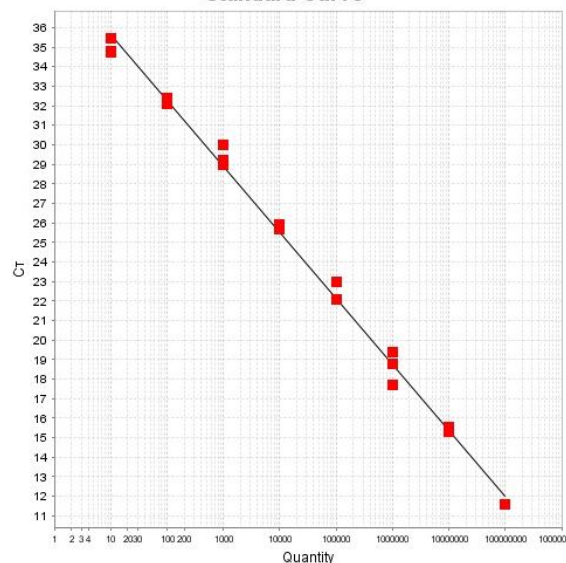
Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs / Quantification / Specific detection
détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

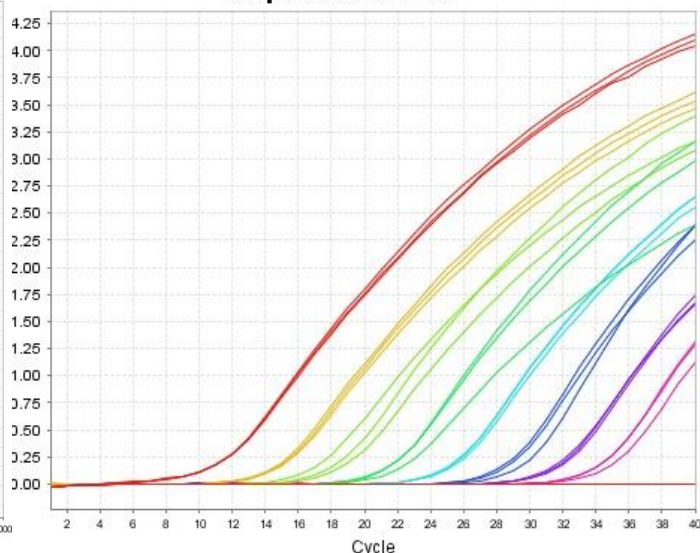
Validation labo
(préparation)

Pathosystème:
Blé – *Zymoseptoria tritici*

Standard Curve



Amplification Plot



VALIDEE en LABO
(outils de biologie
moléculaire classique)

QUANTIFICATION

- Courbe Standard

Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Préparation échantillons

ECHANTILLONS

- Air (spores)
- Feuilles
- Sol
- ...

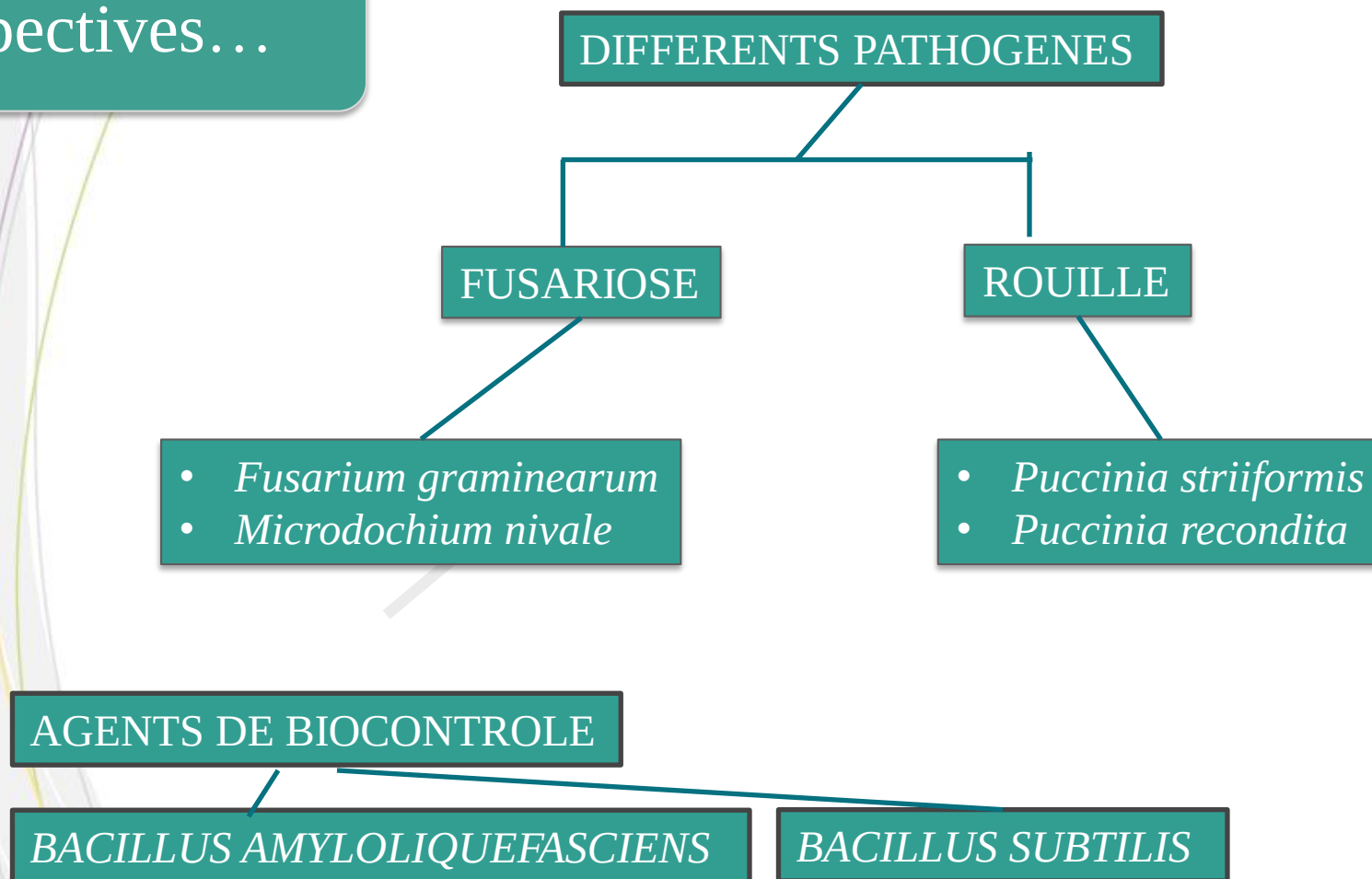
Pathosystème: Blé – *Zymoseptoria tritici*



Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Perspectives...



LIPOPEPTIDES

Project #4 - BIOSENS

Développement de biocapteurs compacts et faciles d'utilisation pour détecter et quantifier pathogènes et agents/produits de biocontrôle

Perspectives...

DIFFERENTS PATHOGENES

FUSARIOSE

ROUILLE

oligonucléotide X

oligonucléotide Y

PUCES
MULTICIBLES

D=100 μ m

25 mm

75 mm

puce à ADN

Image from ESI Montreal

Merci à l'équipe...



Laboratoire de Biotechnologie et
Biologie Appliquée

Websites

<http://www.carah.be>

<http://www.condorcet.be/recherche-appliquee/laboratoire-de-biotechnologie-et-de-biologie-appliquee.html>

- **Déborah Lanterbecq**
Responsable
- **Martin Spanoghe**
Maître-assistant chargé de recherche
- **John Rivière**
Assistant de recherche
- **Meganne Moulin**
Assistant de recherche
- **François Dupont**
Assistant de recherche
- **Camille Dekuijper**
Assistant de recherche



MERCI POUR VOTRE ATTENTION !

DATA: BY THE NUMBERS

