

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**Sélections d'aptamères d'ADN par SELEX pour la détection de la
cyanobactérie *Microcystis aeruginosa***

Par
Timan NAZARI

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Steven Laplante
INRS – Institut Armand Frappier

Examineur externe

Sébastien FAUCHER
McGill University, Faculty of Agricultural
and Environmental Sciences

Directeur de recherche

Jonathan PERREAULT
INRS – Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

Chaque année, de nombreux lacs au Québec ont une surcroissance de la cyanobactérie *Microcystis aeruginosa*, appelée couramment l'algue bleu-vert. Lorsqu'elle est surabondante, *M. aeruginosa* représente un danger pour l'homme et l'environnement en produisant des toxines, comme la microcystine, qui résistent à la plupart des méthodes de traitement des eaux. Certaines méthodes, comme la PCR ou ELISA, permettent de détecter les cyanobactéries ou ses toxines, mais demandent une expertise professionnelle et du matériel coûteux. Dans cette recherche, nous visons à optimiser la méthode SELEX. Cette méthode permet de sélectionner des oligonucléotides spécifiques, nommé des aptamères, qui ont une haute affinité envers un ligand précis. Nous espérons que des aptamères spécifiques à *M. aeruginosa* pourront éventuellement servir à la création de biosenseurs en réseaux de fibre à longue période (LPFG), une fibre optique dont les propriétés varient périodiquement le long de la fibre, et qu'ils nous permettront ainsi le suivi et la prévention de *M. aeruginosa*. Le SELEX commence par un grand nombre d'oligonucléotides d'ADN, différents et aléatoires, où seulement ceux avec une affinité spécifique pour *M. aeruginosa* sont gardés puis répliqués par PCR. Le processus est répété, créant des générations d'oligonucléotides de plus en plus spécifiques et de grande affinité. À la fin d'un SELEX réussit, il est possible d'identifier des aptamères parmi ces oligonucléotides. Dans ce projet, nous avons optimisé le SELEX en testant différentes approches de quantification d'oligonucléotides, par fluorescéine et par l'isotope radioactif ^{32}P , ainsi que la PCR asymétrique (aPCR) pour amplifier les nouvelles générations d'oligonucléotides du SELEX. Ensuite nous avons analysé neuf générations d'oligonucléotides d'un SELEX amplifié avec la PCR asymétrique optimisée. Nous concluons que la PCR asymétrique devrait être jumelée avec des méthodes de purification efficace puisque celle-ci crée de nombreux artéfacts plus que les générations du SELEX augmentent.

ABSTRACT

Each year, many Canadian lakes show overgrowth of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, known as a blue-green algae. When overgrowing, *M. aeruginosa* strains can produce toxins, like the microcystin, that can affect animals and the environment. Those toxins are resistant to most water treatment methods and can thus be dangerous for us. Currently, detection techniques or sensors against the bacteria or the toxin, PCR or ELISA for example, require time, expertise or need high-cost material. In this project, we want to create "ready to use" biosensors against all *M. aeruginosa* strains to prevent possible contamination. The sensor is made of long-period fiber gratings (LPFGs), an optical fiber with the properties periodically varying along the fiber, and biosensing material, aptamers. Aptamers are oligonucleotides with a specific affinity to a molecule, and are found by using SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment). This method consists in selecting and then amplifying the best oligonucleotides that bind *M. aeruginosa*, among synthetic random sequences of DNA. The process is repeated many times, making new generations of oligonucleotides more specific to *M. aeruginosa*. In this research, we did the optimization of SELEX by testing quantification methods and by using asymmetric PCR to amplify each new generation of oligonucleotides. Then, we analyzed nine generations of oligonucleotides from an optimised aPCR SELEX. We conclude that asymmetric PCR amplifies many artefacts, which increased with each generation, and that we should look for a better way to amplify, purify and quantify our SELEX.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION.....	13
1.1	LES CYANOBACTÉRIES	13
1.1.1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	15
1.1.2	Les cyanotoxines.....	17
1.1.3	La microcystine.....	17
1.2	LES LACS AU QUÉBEC.....	19
1.2.1	Traitements des eaux.....	19
1.3	LA DÉTECTION DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	20
1.3.1	La fibre LPFG	21
1.3.2	Les aptamères.....	23
1.3.3	Les bactériophages	24
1.4	SELEX.....	25
1.4.1	Sélections	26
1.4.2	Quantification.....	27
1.4.3	Amplification des nouvelles générations	28
1.4.4	Réaction PCR asymétrique (aPCR).....	28
1.4.5	Fin du SELEX.....	29
1.5	OBJECTIFS.....	30
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
2.1	LA CULTURE DES SOUCHES CYANOBACTÉRIENNES	33
2.1.1	Réception des souches cyanobactériennes de l'UQAM	33
2.1.2	Réception de la souche <i>M. aeruginosa</i> NIES-298	33
2.1.3	Suspension des cyanobactéries.....	34
2.1.4	Optimisation du milieu des cultures de <i>M. aeruginosa</i> NIES-298.....	34
2.1.5	Suivi de la croissance des cyanobactéries	35
2.1.6	Photographie au microscope confocal de <i>M. aeruginosa</i>	35
2.2	IDENTIFICATION DES SOUCHES CYANOBACTÉRIENNES.....	35
2.2.1	Amplification de l'ARN 16S des souches	35
2.2.2	Clonage TA.....	36
2.2.3	Transformation avec les cellules compétentes NEB#2987.....	36
2.2.4	Préparation des boîtes de Petri pour les criblages bleu/blanc.....	37
2.2.5	Isolement des colonies	37

2.2.6	<i>Vérification de l'insertion de la séquence du 16S</i>	37
2.2.7	<i>Le séquençage des plasmides</i>	38
2.3	LES LIBRAIRIES ET LES AMORCES DU SELEX	38
2.3.1	<i>Réception des librairies et de leurs amorces</i>	38
2.3.2	<i>Purification des amorces</i>	38
2.3.3	<i>Précipitation</i>	39
2.3.4	<i>Optimisation de la température d'appariement des amorces</i>	39
2.3.5	<i>Tester le nombre de cycles de l'aPCR</i>	40
2.4	LE SELEX	40
2.4.1	<i>La première sélection</i>	40
2.4.2	<i>Les générations suivantes</i>	42
2.5	ANALYSE DU SELEX	43
2.5.1	<i>Production du simple brin par aPCR et purification</i>	43
2.5.2	<i>Analyse par le radio-isotope ³²P</i>	44
2.5.3	<i>Analyse avec la fluorescéine</i>	45
2.5.4	<i>Séquençage haut débit</i>	46
3	RÉSULTATS	47
3.1	CROISSANCE ET IDENTIFICATION DES SOUCHES.....	47
3.2	OPTIMISATION DU SELEX.....	54
3.2.1	<i>Mise au point de l'amplification par PCR et par aPCR</i>	54
3.2.2	<i>Mise au point de la quantification</i>	55
3.3	SÉQUENÇAGE DU SELEX	58
4	DISCUSSION	59
4.1	LES SOUCHES <i>MICROCYSTIS</i>	59
4.2	LE SELEX AVEC LA CIBLE <i>M. AERUGINOSA</i>	59
4.2.1	<i>La quantification</i>	59
4.2.2	<i>Le séquençage</i>	61
5	CONCLUSION	64
6	REFERENCES	67
	ANNEXES	71
	ANNEXE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE	72
	ANNEXE 2 : LES SOLUTIONS	75
	ANNEXE 3 : LES OLIGONUCLÉOTIDES	76
	ANNEXE 4 : LES SÉLECTIONS NÉGATIVES	77
	ANNEXE 5: SÉQUENÇAGE DU SELEX	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Efflorescence de cyanobactéries à la surface du lac Tai.	p.14
Figure 1.2 Classification taxonomique de <i>M. aeruginosa</i> .	p.15
Figure 1.3 Microcystis au microscope photonique.	p.16
Figure 1.4 Squelette de la microcystine.	p.18
Figure 1.5 L'organisation du <i>locus</i> de gènes de la synthèse de la microcystine.	p.19
Figure 1.6 Principe de la fibre LPFG.	p.22
Figure 1.7 Variation de l'onde évanescente en fonction de la concentration d' <i>E. coli</i> .	P.23
Figure 1.8 Aptamère d'ARN liant son substrat, la néomycine.	p.24
Figure 1.9 Cycle complet d'un SELEX contre <i>M. aeruginosa</i> .	p.26
Figure 1.10 Affinité des générations d'un SELEX contre <i>E. coli</i> .	p.29
Figure 3 1. PCR de l'ARNr 16S des souches cyanobactériennes.	p.51
Figure 3.2 : Détermination des conditions de températures optimales d'appariement des amorces et du nombre de cycle optimal pour l'amplification par aPCR.	p.55
Figure 3.3 Photographie de <i>M. aeruginosa</i> au microscope confocal	p.56
Figure 3.4 Pourcentage d'ADN des générations du SELEX par aPCR liant <i>M. aeruginosa</i> quantifié par fluorescence ou par radioactivité.	P.57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Variation de l'onde évanescente en fonction de la concentration d' <i>E. coli</i> .	p.21
Tableau 3.1 Croissance de la souche <i>M. aeruginosa</i> NIES-298 selon son milieu suspendu et sa dilution.	p.48
Tableau 3.2 : DO 750nm des souches <i>Microcystis</i> sur 25 jours d'incubation	p.49
Tableau 3.3 Comparaison de l'ARNr 16S des souches avec la banque NCBI.	p.52
Tableau 3.4 Résumé du séquençage Hiseq du SELEX par aPCR des générations 3, 6 et 9.	p.58
Tableau 7.1 Noms et séquences des oligonucléotides utilisés lors des PCR	p.76
Tableau 7.2 Les souches utilisées de la sélection négative de chaque génération du SELEX.	p.77
Tableau 7.3 Les 10 premiers résultats du séquençage des générations 3, 6 et 9 du SELEX.	p.78
Tableau 7.4 Séquençage de l'amplification avec les amorces TN005_27F et TN006_809R des cinq souches <i>Microcystis</i> .	p.79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

aPCR: asymmetric PCR

ARN: acide ribonucléique

ARNr: ARN ribosomal

ADP: adenosine diphosphate

ATP: adénosine triphosphate

DL50: dose létale médiane

DO: densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA: éthylènediaminetétraacétique

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EPS: extracellular polymeric substances

G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate

HPLC: high-performance liquid chromatography

IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

L-Arg, ou R: L-arginine

L-Leu, ou L: L-leucine

LPFG: long-period fiber grating

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

M. aeruginosa: *Microcystis aeruginosa*

M. flos-aquae: *Microcystis flos-aquae*

M. wesenbergii: *Microcystis wesenbergii*

mM: millimolaire

ml: millilitre

nm: nanomètre

nM: nanomolaire

nt: nucléotides

PFA: paraformaldéhyde

PCR: polymerase chain reaction

PEG: polyéthylène glycol

³²P: phosphore-32

Rpm: rotation par minute

RT-qPCR: real-time PCR

SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment

TLC: Thin-layer chromatography

T_m: melting temperature

ufc: unité formant une colonie

μl: microlitre

μM: micromolaire

V: volt

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

1 INTRODUCTION

1.1 Les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont souvent appelées, à défaut, les « algues bleu-vert ». Les cyanobactéries sont, en réalité, des bactéries à Gram négatif. Taxonomiquement, les cyanobactéries sont un embranchement, du domaine des bactéries, comportant une seule classe, les cyanophycées. Les cyanobactéries existaient il y a environ 3,8 milliards d'années, durant l'éon de l'Archéen, et elles seraient l'ancêtre des chloroplastes des plantes selon la théorie de l'endosymbiose (Whitton *et al.*, 2012). Les cyanobactéries auraient contribué à la Grande Oxydation de la Terre en produisant de l'oxygène par photosynthèse, favorisant ainsi la vie. Même de nos jours, l'embranchement des cyanobactéries comporte plus de 7500 espèces et a un rôle important dans le cycle de l'oxygène et du carbone.

La photosynthèse est un processus bioénergétique qui permet aux organismes de produire de l'ATP et du NADPH en puisant dans l'énergie de la lumière et en libérant du dioxygène (O₂) (Paerl *et al.*, 1996).. En général l'équation chimique est la suivante:



Une deuxième réaction, ne nécessitant pas de lumière, permet aux organismes de fixer le dioxyde de carbone (CO₂) pour produire généralement le G3P. L'équation chimique est la suivante:



L'absorption de l'énergie lumineuse nécessite un pigment photosynthétique. La chlorophylle a, le principal pigment photosynthétique, possède deux pics d'absorption de la lumière d'environ 400 nm et de 700 nm, et une absorption faible entre 500 nm et 600 nm. Ceci donne à la chlorophylle une coloration verte. La phycoérythrine, présente chez certaines espèces cyanobactériennes, possède une faible absorption de la lumière plus grande que 600 nm, lui donnant une couleur rouge. Certaines

cyanobactéries ou algues possèdent même des pigments turquoise, comme la phycocyanine, ou des pigments bruns, comme la xanthophylle (Speer, 1997).

Les facteurs principaux qui déterminent la croissance des cyanobactéries aquatiques sont; la lumière, la température, le pH et la concentration des nutriments comme le phosphate et le nitrate. La majorité des cyanobactéries aquatiques sont coccoïdes (regroupées en sphère) ou filamenteuses (Komárek *et al.*, 2014).

Le seuil tolérable des cyanobactéries dans des eaux servant d'approvisionnement en eau potable est de 2000 ufc/ml (Chorus *et al.*, 1999). Au-delà de cette concentration, les cyanobactéries sont en surcroissance, ce qui entraîne la formation de fleurs d'eau par certaines espèces. Les fleurs d'eau sont en réalité une grande accumulation de biomasse à la surface de l'eau (voir figure 1,1). L'efflorescence des cyanobactéries en fleurs d'eau permet de contrôler leur flottabilité dans l'eau, leur permettant ainsi de chercher les nutriments et la quantité de lumière optimale pour leur croissance (Reynolds, 1972).



Figure 1.1 Efflorescence de cyanobactéries à la surface du lac Tai. Image modifiée (Pan *et al.*, 2011).

1.1.1 *Microcystis aeruginosa*

Microcystis aeruginosa est une espèce de cyanobactérie du genre *Microcystis*.

La classification taxonomique de *M. aeruginosa* est la suivante (voir figure 1.2).

Règne : Bactérie

Embranchement : Cyanobactérie

Classe : Cyanophycée

Ordre : Chroococcales

Famille : Microcystaceae

Genre : *Microcystis*

Espèce : *M. aeruginosa*

Figure 1.2 Classification taxonomique de *M. aeruginosa* (O'neil et al., 2012).

M. aeruginosa est l'espèce cyanobactérienne toxique la plus courante des eaux douces eutrophiques. Elle vit dans des environnements allant de 20°C à 32°C, avec une croissance limitée en dessous de 15°C. La croissance de *M. aeruginosa* est favorisée dans un environnement avec une biodisponibilité des phosphates et de nitrates. Les cellules de *M. aeruginosa* ont quelques micromètres de diamètre et sont organisées en grandes colonies sphériques liées par des exopolysaccharides (EPS) (voir figure 1.3). *M. aeruginosa* est normalement bleu-vert pâle, mais peut avoir une teinte plus foncée lorsqu'elle est observée au microscope (O'neil et al., 2012). *M. aeruginosa* possède des vésicules qui peuvent se remplir de gaz. Ces vésicules contrôlent la flottabilité dans l'eau, permettant ainsi à *M. aeruginosa* de se positionner à un niveau optimal, où la quantité de lumière et de dioxyde de carbone est suffisante pour sa croissance.

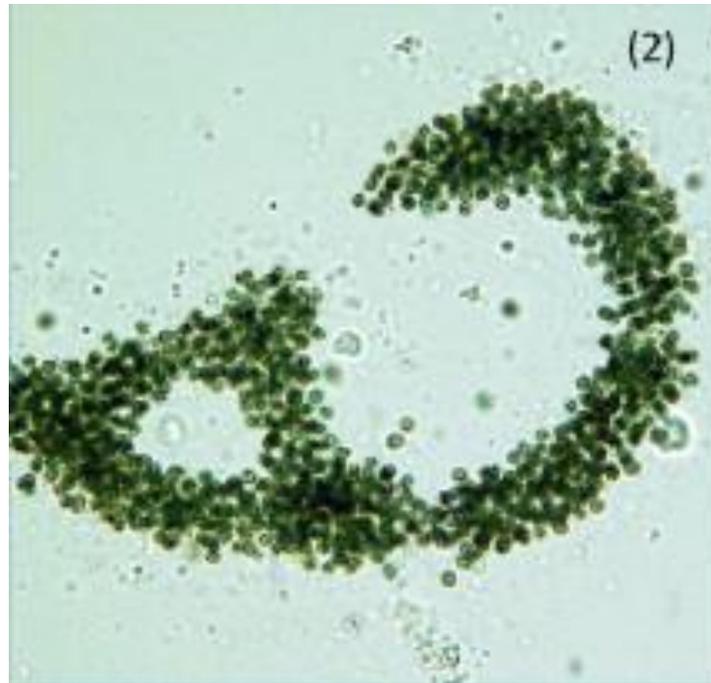


Figure 1.3 *Microcystis* au microscope optique. (O'neil *et al.*, 2012)

Les souches de *M. aeruginosa* sont rarement pures lors de leur croissance en laboratoire. Il est fréquent d'avoir des cultures de *M. aeruginosa* en mélange avec d'autres cyanobactéries ou algues. L'isolement d'une souche précise, par repiquage sur une boîte de Pétri d'agar, prend entre deux à quatre semaines, selon leur vitesse de croissance (Phankhajon *et al.*, 2013). De plus, la procédure est souvent répétée plusieurs fois afin d'avoir une souche parfaitement pure. La croissance de *M. aeruginosa* se fait dans des milieux de culture sans source de carbone, et riche en phosphate et en nitrate (Liu *et al.*, 2011). Des milieux tels que le Z8 et le CB (voir annexe 1), riche en phosphate et en nitrate, correspondent donc aux besoins de *M. aeruginosa* afin de produire des substances protéiques pour leur croissance (Phankhajon *et al.*, 2013). Pour la photosynthèse, *M. aeruginosa* doit être exposé à une quantité suffisante de lumière. Pour être optimale en laboratoire, l'intensité de la lumière doit être entre 10 et 40 μM Einsteins par $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Des cycles de lumière/noirceur de 12h :12h sont optimaux pour *M. aeruginosa* (Krüger *et al.*, 1977). La température de croissance optimale est de 28°C, et de 20°C pour la production maximale de microcystine (Van der Westhuizen *et al.*, 1985), l'une des cyanotoxines les plus fréquentes des eaux douces.

1.1.2 Les cyanotoxines

Certains genres de cyanobactérie sont reconnus comme étant potentiellement toxiques, produisant des cyanotoxines (Chorus *et al.*, 1999). Les cyanotoxines sont divisées en quatre grandes catégories; les peptides cycliques, les alcaloïdes, les polycétides et les acides aminés. Les cyanotoxines peuvent être neurotoxiques, hépatotoxiques, cytotoxiques ou endotoxiques, dépendant de leur type. Les peptides cycliques sont les plus toxiques, notamment la microcystine-LR qui possède un DL50 chez la souris de 50 µg/kg lors d'injections intrapéritonéales (Devlin *et al.*, 2013). Par contre, la principale voie d'exposition à la cyanotoxine est par ingestion d'eau contaminée. La DL50 par voie orale de la microcystine-LR est de 5 mg/kg chez la souris (Svrcek *et al.*, 2004).

1.1.3 La microcystine

La microcystine est une cyanotoxine hépatotoxique formée d'un peptide cyclique de sept acides aminés, un heptapeptide. La microcystine est produite par des cyanobactéries d'eau douce lors de leur efflorescence en fleur d'eau. La conformation en heptapeptide cyclique est très résistante face au changement de pH et de température, pouvant rester stable plusieurs années (Froment-Vedrine, 2005). La concentration tolérée par Santé Canada de la microcystine dans les eaux potables est de 1,5 µg/L.

À ce jour, nous connaissons environ 50 types différents de microcystine. La différence vient principalement de la substitution de deux acides aminés (voir figure 1.4). La nomenclature des microcystines est basée sur ce principe. Par exemple, la microcystine-LR possède une leucine (L-Leu) et une arginine (L-Arg).

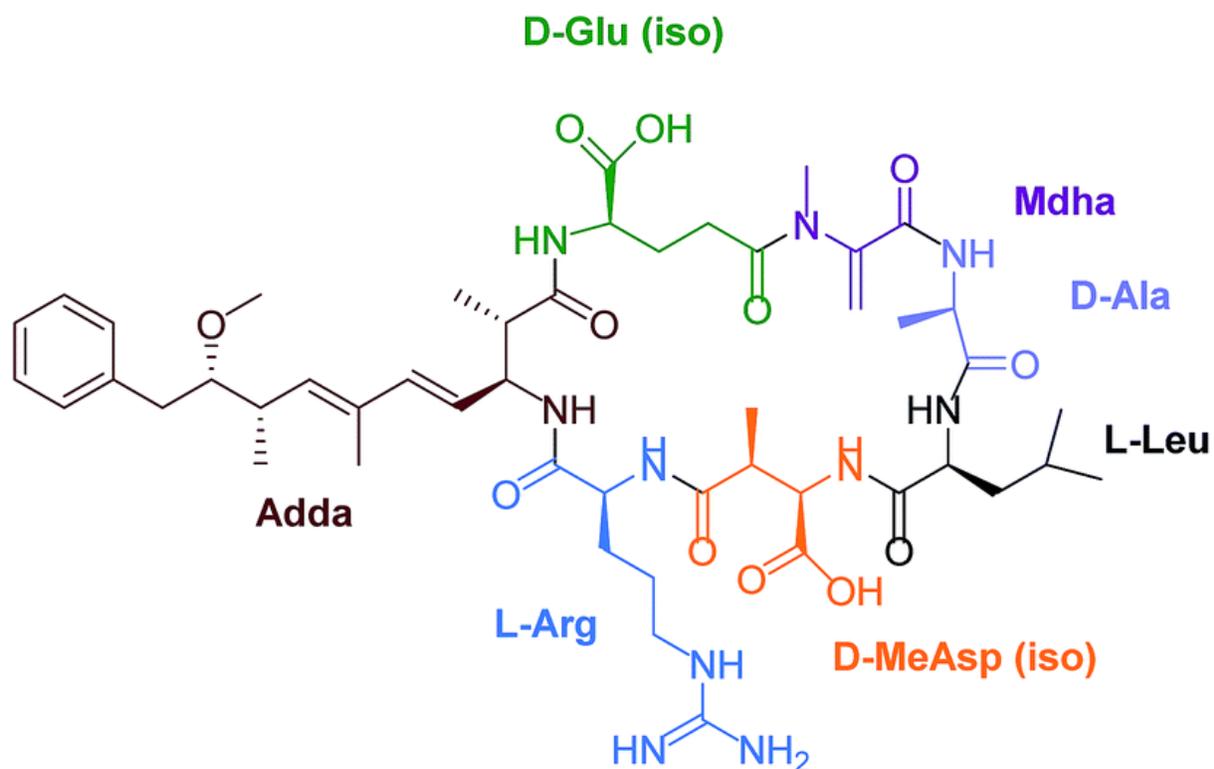


Figure 1.4 Squelette de la microcystine.

Légende : D-Ala; D-Alanine, L-Leu; L-Leucine, D-MeAsp; D-érythro- β -méthyl-D-acide aspartique, L-Arg; L-Arginine, Adda; acide-3-amino-9-méthoxy-2-6-8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque, D-Glu; D-glutamate, Mdma; N-méthyldéhydroalanine (Neumann *et al.*, 2016).

La biosynthèse de la microcystine est faite par la microcystine synthétase, qui est constituée d'un *locus* de gènes hautement conservé, *mcy*, chez les cyanobactéries. Ce *locus* contient normalement deux groupes de gènes, *mcyABC* et *mcyDEFGHIJ* (voir figure 1.5) (Tillett *et al.*, 2000). Cependant, la présence du *locus mcy* chez une souche ne signifie pas nécessairement que cette souche peut produire la microcystine. De plus, des facteurs environnementaux contrôlent l'activité du *locus*. Par exemple, une température de l'eau supérieure à 28°C inhibe la production de microcystine (Van der Westhuizen *et al.*, 1985). De plus, le *locus* est actif lorsque les bactéries sont en quantité suffisante pour former des fleurs d'eau. Il y a une corrélation positive entre le nombre de copies du gène *mcyE* et la toxicité d'une souche (Felexce F Ngwa *et al.*, 2014b).

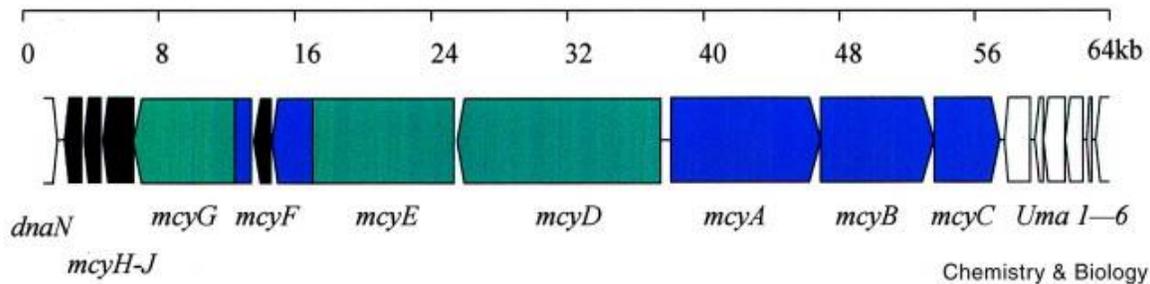


Figure 1.5 L'organisation du locus des gènes de la synthèse de la microcystine.
 Le locus possède 10 gènes, allant de *mcyA* à *mcyJ* et possédant une taille de 64 kb. Les locus *mcyABC* et *mcyDEFGHIJ* sont sur des polarités différentes de l'ADN (Tillett *et al.*, 2000).

1.2 Les lacs au Québec

Selon le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec (MDDELCC), le Québec possède plus d'une centaine de lacs eutrophiques répertoriés et d'eau douce. De plus, nos lacs sont l'habitat de nombreuses espèces cyanobactériennes pouvant être toxique, dont *M. aeruginosa* étant la plus courante. Lors d'ajout de nutriments dans les lacs, tel que le phosphate (PO_4) ou le nitrate (NO_3^-), l'habitat devient propice à la croissance des cyanobactéries, pouvant mener à un déséquilibre de l'écosystème. MDDELCC mentionne également que la source principale d'eutrophisation de lacs est l'activité humaine. Les détergents avec phosphate sont maintenant réglementés au Canada, tolérable à une concentration de 0,5%, tandis que les engrais phosphatés sont toujours couramment utilisés en agriculture. Les déchets d'animaux, comme le fumier, sont également une source d'eutrophisation.

1.2.1 Traitements des eaux

Au Canada, la contamination des lacs due à une surcroissance de *M. aeruginosa* est toujours présente. Notamment au Québec, 59 lacs ont été touchés par une

surcroissance de cyanobactéries entre 2004 et 2008 (Devlin *et al.*, 2013). En 2015, sept lacs du Nouveau-Brunswick ont également été fermés lors d'une contamination aux algues.

Le sulfate de cuivre est un algicide pour traiter la contamination des cyanobactéries. Agriculture et Agroalimentaire Canada réglemente le produit, pouvant être dangereux si des eaux sont traitées par le sulfate de cuivre plus que deux fois par année. Le sulfate de cuivre peut entre autres être responsable de la suffocation des poissons par déplétion de l'oxygène (Corkal *et al.*, 2008). Le sulfate de cuivre doit être utilisé au début de l'efflorescence des cyanobactéries pour être le plus sécuritaire et le plus efficace. Effectivement, la décomposition des cyanobactéries libère leurs cyanotoxines, telles que la microcystine, dans les eaux. Les lacs peuvent donc être toujours toxiques dans les premières semaines du traitement, même lorsqu'il n'y a plus de fleurs d'eaux.

Agriculture et Agroalimentaire Canada mentionne également que la meilleure manière de minimiser la surcroissance de cyanobactéries reste la prévention, notamment en sensibilisant la population sur l'eutrophisation et la pollution des lacs en évitant l'ajout de phosphate, de nitrate et de fumier dans les eaux. Également, le suivi fréquent de la croissance de cyanobactéries d'un lac lors de température chaude (>15°C), permet également le contrôle et la prévention (Corkal *et al.*, 2008).

1.3 La détection de *Microcystis aeruginosa*

L'observation par microscope est un moyen courant d'identifier la présence de *M. aeruginosa* dans les lacs, afin de permettre sa prévention, mais sans toutefois savoir si la souche est toxique ou non. Il est possible aussi de détecter directement la microcystine par ELISA (Zhu *et al.*, 2012), par HPLC (Meriluoto *et al.*, 1998) ou par plusieurs autres méthodes (Msagati *et al.*, 2006, Rapala *et al.*, 2002). Le gène *mycE* de la microcystine synthétase peut également être détecté par qPCR, puisqu'il y a une corrélation positive entre le nombre de copies du gène *mycE* et la production de microcystine (Felexce Ngwa *et al.*, 2014a). Il existe également un biosenseur qui

possède une surface en or couplée avec de l'ADN complémentaire à l'ARN 16S spécifique de *M. aeruginosa*. Ce biosenseur détecte tout changement de masse, créé par la liaison de l'ARN 16S à la surface d'or, grâce à un senseur porte-à-faux (Johnson *et al.*, 2013). Cependant, ces nombreuses méthodes nécessitent du matériel coûteux et une expertise. Il est donc difficile de faire le suivi précis d'un lac puisqu'il faut fréquemment envoyer des échantillons d'eau vers un laboratoire. De plus, la plupart des méthodes détectent les cyanotoxines plutôt que la bactérie, ce qui ne permet pas la prévention des souches non toxiques qui peuvent avoir de grandes répercussions environnementales.

Nous croyons qu'il y a une nécessité d'un nouveau biosenseur simple et efficace pour détecter *Microcystis aeruginosa*. Ce biosenseur doit être relativement peu coûteux, être utilisable par tous, et permettre la détection à une concentration plus petite que 2000 ufc/ml de *M. aeruginosa* dans les lacs. Ainsi, il sera possible de faire un suivi efficace de la croissance de *M. aeruginosa* et de prévenir la surcroissance. Le biosenseur prévu à long terme sera de type « long-period-fiber-grating » (LPFG) et il sera couplé à des aptamères.

1.3.1 La fibre LPFG

La fibre LPFG du biosenseur est une fibre optique SMF-28™ (Tripathi *et al.*, 2012). Cette fibre possède un cœur à indice de réfraction périodique, appelé réseau de Bragg (Yeh *et al.*, 1978). Lorsque la lumière entre dans la fibre LPFG, le réseau de Bragg permet à des faisceaux résonnants, qui possèdent un pic d'une longueur d'onde spécifique appelé l'onde évanescente, de sortir de la fibre au travers de la gaine. Cette onde évanescente ne se retrouve donc pas dans le spectre transmis, mais s'échappe de la fibre avec les faisceaux résonnants (voir figure 1.6). La longueur d'onde évanescente est directement reliée à l'indice de réfraction de la fibre. Lorsque des bactéries ou des molécules de taille suffisante se collent aux parois du réseau de Bragg, par exemple *M. aeruginosa*, la gaine s'épaissit et l'indice de réfraction change. Ainsi, la longueur d'onde évanescente est modifiée, permettant de détecter la liaison entre les bactéries et la fibre.

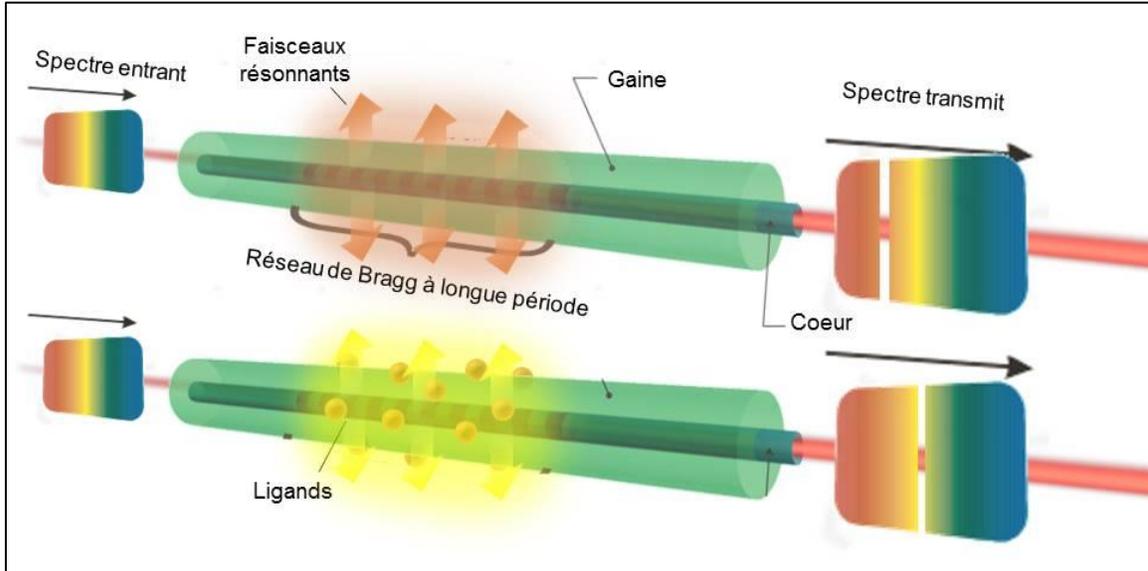


Figure 1.6 Principe de la fibre LPFG.

Les faisceaux résonnants possèdent le pic spectral de l'onde évanescente, qui est manquant dans le spectre transmis. Sur la fibre du bas, des ligands sont liés aux réseaux de Bragg, engendrant une variation de l'onde évanescente. Image faite par Emré Yurdusev.

Les travaux du professeur Wojtek J. Bock de l'Université du Québec en Outaouais ont notamment montré l'efficacité de cette fibre LPFG pour la détection de bactéries (Tripathi *et al.*, 2012). Dans cette étude, la fibre, lorsque couplée avec des bactériophages spécifiques, permettait la détection d'*Escherichia coli* à des concentrations de 10^3 ufc/ml jusqu'à 10^7 ufc/ml (voir tableau 1.1). Ceci fonctionne avec le seuil tolérable de *M. aeruginosa* dans un lac de 2000 ufc/ml.

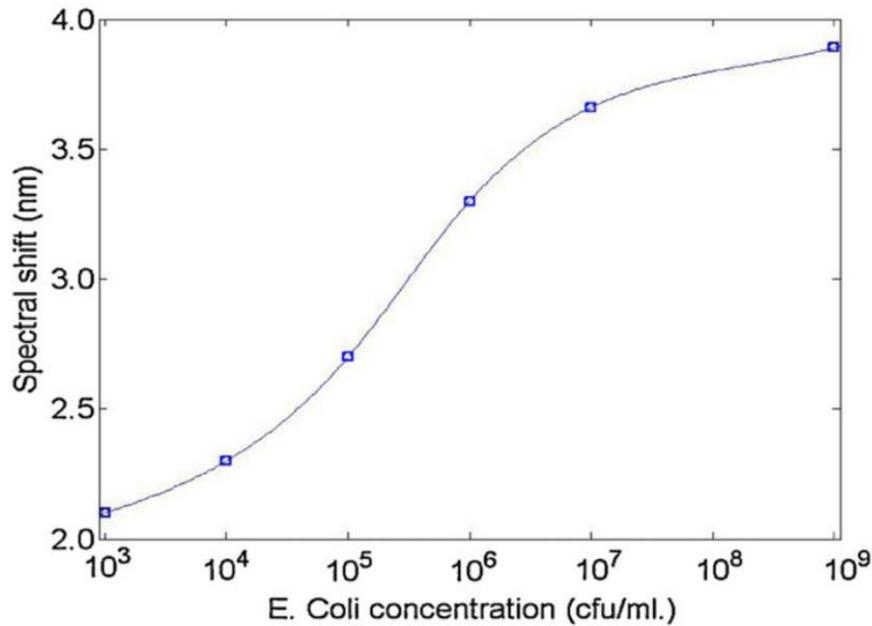


Figure 1.7 Variation de l'onde évanescente en fonction de la concentration d'*E. coli*.

Plus qu'il y a une haute concentration de bactéries dans le milieu, plus qu'il y a une variation de la longueur d'onde évanescente. Le seuil de détection est de 10^3 ufc/ml jusqu'à un plateau de 10^7 ufc/ml. Légende : spectral shift (nm); variation de l'onde évanescente en nanomètre. Image modifiée (Tripathi *et al.*, 2012).

1.3.2 Les aptamères

Un aptamère est un oligonucléotide simple brin, d'ARN ou d'ADN, avec la capacité de lier spécifiquement un ligand, grâce à leur conformation (voir figure 1.7) (Ellington *et al.*, 1990). Un aptamère peut être synthétiquement produit en grande quantité par PCR et il peut être sélectionné par la méthode SELEX (Ohk *et al.*, 2010). Dans les bonnes conditions, la liaison entre deux nucléotides d'ADN possède une demi-vie de 521 ans (Allentoft *et al.*, 2012), donc un aptamère d'ADN de 100 nt prend en moyenne quelques années avant de se dégrader. Au contraire, un aptamère d'ARN se dégrade rapidement dû au groupement 2'OH. Nos biosenseurs utiliseront donc des aptamères d'ADN, car ils sont plus résistants et stables que des aptamères d'ARN. Ceci est essentiel pour notre biosenseur, puisqu'il ne doit pas se dégrader lors de son exposition à l'eau d'un lac, et il doit également se conserver le plus longtemps possible pour faciliter le suivi. Il y a également plusieurs avantages d'utiliser un aptamère par rapport à utiliser un anticorps,

notamment, le fait qu'il peut être facilement synthétisé et modifié par l'ajout de groupements précis (Berezovski *et al.*, 2006).

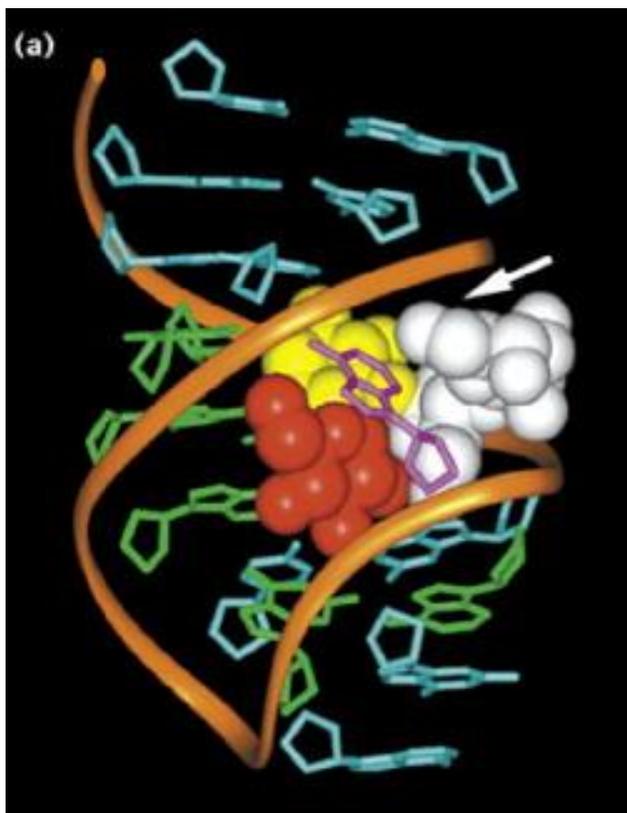


Figure 1.8 Aptamère d'ARN liant son substrat, la néomycine. L'image montre comment un aptamère peut lier une cible. Ici, la conformation de l'aptamère permet exactement à la néomycine, en jaune, blanc et rouge, d'avoir une bonne liaison. Image modifiée de (Jiang *et al.*, 1999).

Un aptamère peut être spécifique à une bactérie, comme *M. aeruginosa*, en liant une composante précise et unique chez cette bactérie, par exemple, des peptidoglycanes, des lipopolysaccharides, ou simplement une protéine membranaire spécifique (Marton *et al.*, 2016). Il est possible d'ajouter des groupements aux extrémités d'un aptamère, comme un glutaraldéhyde, afin de permettre son attachement à une fibre LPFG.

1.3.3 Les bactériophages

Une alternative envisagée pour servir au biosenseur LPFG, autre que les aptamères, sont les bactériophages. Les bactériophages sont des virus à bactéries composés d'une tête qui encapsule leur génome d'ADN ou d'ARN, et d'une queue qui possède

une affinité envers des bactéries spécifiques. Il n'existe malheureusement qu'un seul bactériophage d'une souche *M. aeruginosa* connu à ce jour, le bactériophage Ma-LMM01 spécifique à la souche *M. aeruginosa* NIES-298 (Yoshida *et al.*, 2008). Il est également possible que le phage Ma-LMM01 ait une affinité spécifique à toutes les souches de *M. aeruginosa* seulement, et ainsi servir à leur détection dans les lacs.

1.4 SELEX

La méthode *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment* (SELEX), est une sélection *in vitro* d'aptamères qui a été inventée en 1990, au début de l'utilisation de la PCR (Tuerk *et al.*, 1990) (Ellington *et al.*, 1990). La méthode commence avec une banque aléatoire d'environ 10^{16} séquences d'oligonucléotides synthétiques d'environ 100 bases. Seulement les extrémités 5' et 3' des oligonucléotides sont connues afin de les amplifier par PCR. Au cours de la méthode SELEX, des aptamères, qui se trouvent dans la banque d'oligonucléotides aléatoires, sont sélectionnés puis amplifiés selon leur affinité au ligand choisi et les conditions expérimentales déterminées. Ces étapes de sélection et d'amplification sont répétées en cycle, donnant des générations de SELEX plus spécifiques et de grande affinité pour le ligand, jusqu'à atteindre un plateau d'affinité. Au final d'un SELEX, la banque d'oligonucléotides ne contient en principe que les meilleurs aptamères sélectionnés pour lier le ligand (Ellington *et al.*, 1990). La méthode SELEX peut être utilisée afin d'avoir des aptamères d'ADN spécifiques à *M. aeruginosa* (voir figure 1.8) (Rong *et al.*, 2016). Ce genre de SELEX, qui a pour cible des cellules, se nomme du Cell-SELEX.

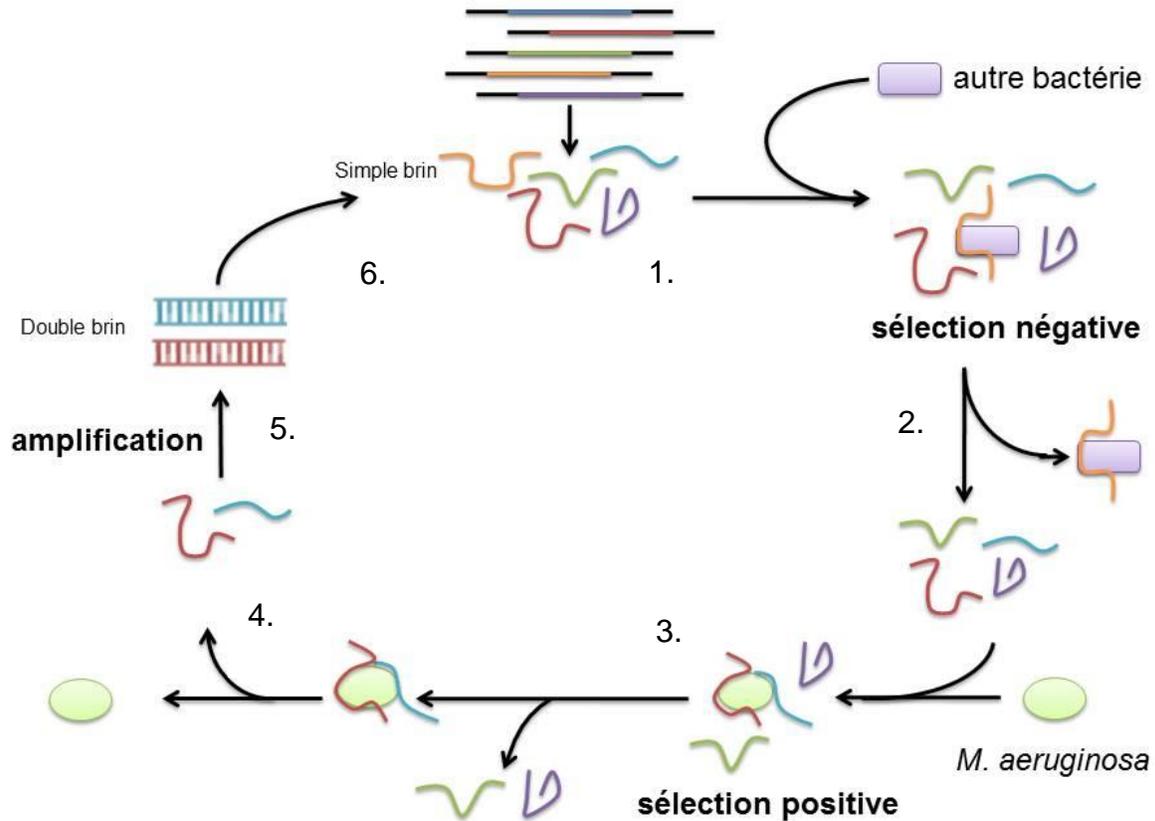


Figure 1.9 Cycle complet d'un SELEX contre *M. aeruginosa*. Les lignes colorées représentent des oligonucléotides différents durant le SELEX. Chaque oligonucléotide peut prendre une conformation différente et ainsi avoir des affinités variables envers une cible. 1. Génération d'oligonucléotides simple brin. Lors du premier cycle, la librairie de simple brin a été commandée et synthétisée. Pour les autres cycles, le simple brin provient d'une amplification par aPCR. 2. Sélection négative avec une bactérie autre que notre cible. 3. Sélection positive avec notre bactérie cible, *M. aeruginosa*. 4. Récupération des oligonucléotides sélectionnés 5. Amplification par PCR des oligonucléotides sélectionnés. 6. Amplification d'une nouvelle génération de simple brin par aPCR.

1.4.1 Sélections

Lors de l'étape de sélection, la banque d'oligonucléotides subit des sélections négatives et des sélections positives. Une sélection négative est effectuée en exposant la banque à des espèces de bactéries autres que notre cible. Si notre cible est *M. aeruginosa*, une souche d'*Escherichia coli* serait un exemple d'une sélection négative peu stringente,

tandis que *Microcystis wesenbergii* serait une sélection négative beaucoup plus stringente puisqu'elles sont du même genre *Microcystis*. Effectivement, la sélection négative a pour but d'augmenter la spécificité de la banque pour *M. aeruginosa*, en éliminant le plus possible d'aptamères liant d'autres espèces de bactéries. Par exemple, certains aptamères peuvent lier toutes les bactéries ou toutes les espèces d'un même genre. La sélection négative permet donc d'éliminer ces aptamères non spécifiques à *M. aeruginosa* (Sefah *et al.*, 2010).

Une sélection positive est effectuée en exposant la banque à différentes souches de notre espèce cible. Par exemple, dans notre cas, la sélection positive pourrait se faire avec la souche *M. aeruginosa* NIES-298 et aurait pour but d'augmenter l'affinité de la banque pour *M. aeruginosa*, en ne conservant que les aptamères liants *M. aeruginosa*. En variant les souches de *M. aeruginosa* durant la sélection positive, on élimine des aptamères qui seraient spécifiques à une seule souche de *M. aeruginosa* et qui ne reconnaîtraient pas d'autres souches (Hamula *et al.*, 2016).

1.4.2 Quantification

Il existe plusieurs moyens de quantifier les aptamères durant le SELEX. Cette étape de quantification est importante durant le SELEX pour savoir si l'affinité des aptamères envers leur ligand s'améliore et si elle a atteint un plateau. La qPCR (Dwivedi *et al.*, 2013), le radiomarquage à l'isotope phosphore-32 (³²P) (Mouret *et al.*, 1990), ou le marquage à la fluorescéine (Loeffler *et al.*, 2000) peuvent servir à quantifier des faibles concentrations d'ADN.

La fluorescéine est un fluorochrome avec un pic d'absorption à une longueur d'onde de 494 nm et une émission à une longueur d'onde de 512 nm (Sun *et al.*, 1997). Lors du SELEX, une banque d'oligonucléotides et leurs amorces peuvent être synthétisées avec une fluorescéine afin de permettre la quantification.

Le radiomarquage à l'isotope phosphore-32 est une méthode plus sensible que la fluorescéine pour quantifier les aptamères. Un phosphate provenant d'un [γ -³²P]ATP peut être ajouté en 5' des aptamères avec une protéine kinase, la T4 polynucléotide

kinase (T4 PNK). Les aptamères marqués peuvent être quantifiés avec un détecteur à scintillation (Hastie *et al.*, 2006).

1.4.3 Amplification des nouvelles générations

La régénération est la dernière étape de chaque cycle du SELEX. Après les sélections, les aptamères conservés sont amplifiés par PCR, ils se retrouvent alors en double brin. Pour régénérer une nouvelle génération de SELEX, prête pour un nouveau cycle de SELEX, les aptamères doivent être en simple brin. De plus, les brins complémentaires des aptamères ne doivent pas être présents dans la génération, au risque de s'apparier aux aptamères et d'empêcher leurs bonnes conformations pour lier le ligand (Tabarzad *et al.*, 2014). Plusieurs méthodes de purification peuvent permettre la régénération sans le brin complémentaire. Par exemple, l'amorce anti-sens couplée avec un groupement polyéthylène glycol (PEG) fera migrer le brin complémentaire moins loin dans un gel dénaturant. L'amorce anti-sens peut aussi avoir une insertion d'un ribonucléotide dans sa séquence, ce qui permettra facilement le bris du brin complémentaire, où que le ribonucléotide se trouve, lors de l'ajout de NaOH et du chauffage. La digestion enzymatique avec des nickases spécifiques ou la lambda exonucléase peut produire du simple brin en dégradant le brin complémentaire (Svobodová *et al.*, 2012). La réaction de PCR asymétrique (aPCR) sera la méthode utilisée durant ce SELEX.

1.4.4 Réaction PCR asymétrique (aPCR)

Une aPCR est un moyen simple, sans étape de purification nécessaire, d'amplifier préférentiellement que l'un des brins d'ADN. Comme la réaction PCR habituelle, une aPCR se fait avec un thermocycleur et les mêmes réactifs. La différence est la concentration inégale des deux amorces. Par exemple, la concentration de l'amorce anti-sens est 10 fois moindre que la concentration de l'amorce sens (Svobodová *et al.*, 2012). Ainsi, les amorces sens, en excès, ne produisent que des brins sens. Lors d'un SELEX, l'amplification asymétrique permet d'amplifier majoritairement les aptamères, avec peu de séquences complémentaires, pour régénérer la librairie.

Il est également possible d'ajouter une étape de purification, après une aPCR, afin d'obtenir uniquement les brins sens. Un gel de polyacrylamide natif permet aux brins complémentaires d'être appariés durant l'électrophorèse. Ainsi, il est possible de récupérer uniquement les brins sens, en simple brin et en excès, qui migreront plus loin dans le gel que le double brin.

1.4.5 Fin du SELEX

Lorsqu'une génération de SELEX ne possède pas plus d'affinité envers sa cible que la génération d'avant, c'est-à-dire qu'un plateau est atteint, il faut arrêter le SELEX ou changer les conditions pour les rendre plus rigoureuses (voir figure 1.9). Le changement d'une condition risque de faire baisser l'affinité des aptamères, qui ont été sélectionnés avec des conditions très précises. Éventuellement, après plusieurs autres générations suivant le changement d'une condition, l'affinité des aptamères atteindra à nouveau un plateau (Tuerk *et al.*, 1990).

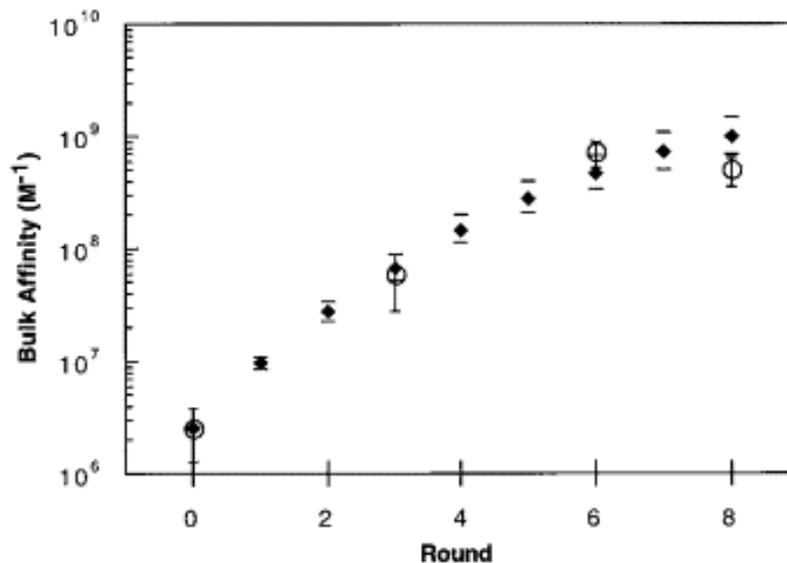


Figure 1.10 Affinité des générations d'un SELEX contre *E. coli*.

L'affinité de ce SELEX plafonne à la génération 8. Il y a environ 100 fois plus d'oligonucléotides qui peuvent lier *E. coli* entre la librairie de départ et la génération 8. Légende : Bulk affinity ; le nombre d'oligonucléotides ayant fixé *E. coli*, Round ; la génération du SELEX. Les points en losange et ceux en cercle représentent des duplicatas différents de la librairie initiale. Image modifiée de (Vant-Hull *et al.*, 1998).

Si on juge que les générations ont atteint leur plein potentiel d'enrichissement pour des aptamères, il est possible de séquencer les générations de SELEX et d'identifier les séquences de potentiels aptamères. Par la suite, les séquences précises d'aptamères choisis peuvent être synthétisées puis testées pour valider leur affinité et les ajuster pour leurs applications.

1.5 Objectifs

Il y a une nécessité actuelle de prévenir la surcroissance de *M. aeruginosa*, dans les lacs, avant la production de microcystines (voir 1.1). Pour cela, il faudrait que chaque propriétaire ou gestionnaire d'un bassin d'eau soit capable de vérifier facilement et périodiquement l'état de l'eau. Des biosenseurs permettant une détection simple, rapide et spécifique de *M. aeruginosa* pourraient aider à régler ce problème. Pour développer de tels biosenseurs, nous souhaitons sélectionner des aptamères contre *M. aeruginosa*.

Une grande difficulté du projet sera la production d'ADN simple brin entre chaque génération du SELEX, sans avoir trop d'étapes. Effectivement, produire du simple brin avec le moins possible d'impuretés et d'artéfacts, tout en permettant également la quantification, peut être complexe.

Nous croyons pouvoir sélectionner des aptamères de *M. aeruginosa* par SELEX et que ces aptamères pourront servir à la fabrication de biosenseurs pour la prévention de *M. aeruginosa*. Nous émettons également l'hypothèse que l'aPCR, jumelé avec une méthode de purification par gel, est une méthode efficace de produire du simple brin avec un minimum d'artéfacts (voir 1.4).

Mes objectifs de recherche sont les suivants.

1. Optimiser le SELEX par aPCR
 - a. Mise au point de la PCR et de l'aPCR
 - b. Mise au point de purifications et des sélections
 - c. Mise au point de la quantification par ^{32}P et par la fluorescéine

2. Sélectionner des aptamères de *M. aeruginosa*
 - a. Faire le protocole du SELEX
 - b. Quantifier l'affinité des générations
 - c. Séquencer les générations du SELEX
 - d. Trouver des séquences à tester en tant qu'aptamères

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 La culture des souches cyanobactériennes

2.1.1 Réception des souches cyanobactériennes de l'UQAM

Les souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae* et *M. wesenbergii* nous ont été données au printemps 2014 par le laboratoire de David Bird, à l'UQAM. Les souches ont été cultivées dans le milieu Z8 (voir annexe 1), puis identifiées par une technicienne de l'UQAM par observation au microscope. Les cultures reçues ont été placées dans l'incubateur (Multitron Pro, de Infors HT) avec un cycle de lumière/noirceur (12h :12h), à 25°C et à 100 rpm. 2/3 des ampoules de l'incubateur ont été allumées durant l'incubation (Van der Westhuizen *et al.*, 1985). Les souches *M. aeruginosa* 13 et *M. aeruginosa* 18 ont été récoltées au Québec et sont utilisées pour les sélections positives du SELEX. *M. flos-aquae*, provenant du Maroc, et *M. wesenbergii* sont du même genre mais d'une espèce différente de *M. aeruginosa*, une qualité importante pour les sélections négatives stringentes.

2.1.2 Réception de la souche *M. aeruginosa* NIES-298

La souche *M. aeruginosa* NIES-298 en provenance du Japon, de Microbial Culture Collection (National Institute for Environmental Studies), est initialement en culture dans du milieu CB (voir annexe 1). Lors de sa réception, *M. aeruginosa* NIES-298 a été mis en deux cultures de 20 mL diluées dans un ratio de 1:3 de la culture initiale commandés avec du milieu CB. Deux autres cultures de 20 mL ont été faites mais dans un ratio de 1:10. Afin de s'assurer qu'au moins une des cultures survit, ils ont été placés dans l'incubateur à 25°C et aux mêmes conditions décrites en 2.1.1, ou sur le bord de la fenêtre à 21°C. La culture qui a été diluée dans 1:3 de milieu CB et placés dans l'incubateur a été utilisé pour produire une première culture de 50 mL, ratio de 2:5 avec du milieu CB, dans un erlenmeyer de 250 mL stérile et fermé avec un bouchon en

mousse et de l'aluminium. Cette nouvelle culture a été placée dans l'incubateur aux mêmes conditions. *M. aeruginosa* NIES-298 a été utilisée lors des sélections positives du SELEX et peut être utilisée si nous décidons de tester le bactériophage spécifique Ma-LMM01.

2.1.3 Suspension des cyanobactéries

Afin de maintenir les souches en provenance de l'UQAM (*M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae* et *M. wesenbergii*), à chaque trois semaines, elles ont été suspendues, sous une hotte biologique, dans 95 mL de milieu Z8 et dans 5 mL de la culture précédente. Le volume total est de 100 mL, avec une dilution de 1 :20, dans un erlenmeyer de 250 mL stérile et fermé avec un bouchon en mousse et de l'aluminium. Les cultures ont été conservées jusqu'à deux mois dans l'incubateur aux conditions décrites en 2.1.1. Les cultures de *M. aeruginosa* NIES-298, ont été suspendues à chaque deux semaines dans 50 mL de milieu CB et 50 mL de l'ancienne culture *M. aeruginosa* NIES-298, donnant une dilution de 1 :2. Les cultures *M. aeruginosa* NIES-298 ont été incubées aussi aux mêmes conditions que les autres cultures du laboratoire.

2.1.4 Optimisation du milieu des cultures de *M. aeruginosa* NIES-298

La souche *M. aeruginosa* NIES-298 a été suspendue dans neuf erlenmeyers contenant un volume total de 100 mL de milieu Z8, de milieu CB ou de milieu BG-11, à des dilutions de soit 1 :2, 1 :5 ou 1 :10. Les erlenmeyers ont été mis en incubation (2.1.1) pendant deux semaines. Les cultures qui ont eu une croissance, déterminée selon la présence ou non de pigments dans le milieu, ont été notées.

2.1.5 Suivi de la croissance des cyanobactéries

Les cultures des souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii* et *M. aeruginosa* NIES-298 ont été suspendues comme en 2.1.3 dans du milieu Z8, et avec du milieu CB pour *M. aeruginosa* NIES-298 seulement. Sur 25 jours d'incubation avec un cycle de lumière/noirceur (12h :12h), à 25°C et à 100 rpm, la densité optique à 750 nm de chaque culture a été mesurée à chaque jour au spectrophotomètre (Nanodrop 2000c, ThermoScientific) en y mettant 2 µL, avec de l'eau milli-Q comme blanc.

2.1.6 Photographie au microscope confocal de *M. aeruginosa*

Cette étape de photographie est importante pour confirmer que la fluorescéine est un moyen efficace de quantifier l'amorce fluorescente MC001_F lorsqu'elle est couplée à *M. aeruginosa*. La photographie au microscope confocal a été faite avec la souche *M. aeruginosa* 13 uniquement. Après deux semaines de croissance, la souche *M. aeruginosa* 13 a été diluée à une DO. 750 nm de 0,5 et de 0,05 avec une solution de 0,5% de paraformaldéhyde (PFA). 10 µL de ces dilutions ont été placés sur une lamelle, puis ont été observés au microscope confocal avec un laser de 543 nm. Les spectres émis par *M. aeruginosa* 13 ont été comparés avec ceux de l'amorce MC001_F couplée à une fluorescéine (voir annexe 3) avec une dilution de 5 µM et de 0,5 µM.

2.2 Identification des souches cyanobactériennes

2.2.1 Amplification de l'ARN 16S des souches

Pour confirmer l'identité de nos souches, *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii* et *M. aeruginosa* NIES-298 ont été identifiées à partir de la séquence de l'ARN ribosomique 16S. Les amorces TN005_27F et TN006_809R, synthétisées par Biocorp DNA inc, ont été utilisées pour amplifier par PCR un fragment spécifique aux cyanobactéries de 782 pb du 16S (Saker *et al.*, 2005). La PCR contient

0,5 μ M des deux amorces, 50 unités/mL de polymérase (One *Taq* DNA polymerase, de NEB), des dNTP (deoxynucleotide Solution Mix, de NEB) à 0,2 mM et du tampon de PCR à 1x (*Standard Taq* buffer, de NEB). L'ADN qui a été amplifié par la PCR provient d'une dilution de 1:100 de chacune de souches après deux semaines de croissance. Le total de 100 μ L de chaque produit de PCR, contenant 1 μ L de nos souches diluées, a été placé au thermocycleur (T100 Thermal Cycler, de Bio-Rad). La PCR commence avec 3 minutes à 95°C. Puis la PCR fait 30 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 56°C, et 1 minute à 72°C. Après les 30 cycles, il y a une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 2%, avec une migration de 45 minutes à 120 V. Le gel a été observé avec du bromure d'éthidium au GeldocTMXR+ (Bio-Rad), avec une échelle de 1 kb (1 kb DNA Ladder, de NEB).

2.2.2 Clonage TA

Le produit de PCR de la région de l'ARNr 16S a été ensuite inséré dans le plasmide pGEM-T EasyVector de Promega. L'insertion se fait à une concentration du plasmide pGEMT de 50 ng/ μ L, du tampon de liaison (2X Rapid Ligation Buffer, Promega) à 1X, 300 unités par mL de l'enzyme T4 DNA Ligase (Promega) et 3 μ L de produit de PCR dans un volume total, ajusté avec de l'eau milli-Q, de 10 μ L, cela dans des tubes de 200 μ L. Les tubes ont été incubés au thermocycleur pendant 12 heures à 15°C.

2.2.3 Transformation avec les cellules compétentes NEB#2987

Ces étapes ont été faites stérilement sous une flamme. Les cellules compétentes *E. coli* DH5 α NEB#2987 (NEB) ont été décongelées du -80°C sur glace. 50 μ L de cellules compétentes avec 5 μ L du produit de ligation (plasmide pGEMT avec l'insertion du produit de PCR des 16S) ont été incubés sur glace 20 minutes. Ensuite, un choc thermique dans un bain-marie à 42°C, pendant 40 secondes, a été fait avec les cellules compétentes. Les cellules ont été remises sur glace 2 minutes, puis transférées dans

une éprouvette 10 mL avec 200 μ L de milieu de culture SOC. Les éprouvettes ont été incubées pendant 2 heures à 200 rpm, dans la chambre à 37°C.

2.2.4 Préparation des boîtes de Petri pour les criblages bleu/blanc

20 mL de LB-agar (voir annexe 1) à 50°C avec 100 μ g/mL d'ampicilline ont été placés dans une boîte de Petri de diamètre de 10 cm. Après 1 heure à 23°C, 10 μ L d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) à 1 mM et 50 μ L de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) à 20 mg/mL ont été étalés sous une flamme avec une pipette en verre pliée. Les boîtes de Petri ont été placées 15 minutes à 37°C, puis conservées à 4°C.

2.2.5 Isolement des colonies

100 μ L et 50 μ L des éprouvettes contenant les cellules transformées ont été incubées pendant 2 heures, puis ont été étendus sur les boîtes de Petri du criblage bleu/blanc avec une pipette en verre pliée. Les boîtes de Petri ont été incubées dans une pièce à 37°C pendant 36 heures. Les boîtes de Petri ont été placées à 4°C pendant 1 heure. Des colonies blanches ont été sélectionnées et piquées avec un manche de Koch dans une éprouvette contenant 5 mL de bouillon LB et d'ampicilline 60 μ g/mL. Les éprouvettes ont été incubées à 37°C, à 200 rpm, pendant 12 heures.

2.2.6 Vérification de l'insertion de la séquence du 16S

Des PCR de 30 cycles, avec les mêmes conditions décrites en 2.1.6, ont été faites en utilisant 1 μ L des bouillons LB incubés avec les colonies blanches. Les amplicons de PCR ont ensuite été regardés sur gel d'agarose 2% pour vérifier si l'insertion de 782 pb s'y trouve. Les plasmides des colonies du 5 ml des bouillons LB incubés ont été extraits avec l'ensemble d'extraction de plasmides (QIAprepminiprep, QIAGEN), en suivant le protocole pour la purification d'ADN plasmidique.

2.2.7 Le séquençage des plasmides

15 μL de chaque plasmide ont été placés dans deux tubes de 200 μL . Les tubes ont été envoyés au service de séquençage de génome Québec par la poste. Les amorces utilisées pour le séquençage sont celles déjà présentes dans le plasmide pGEM-t, le site T7 et SP6 (voir annexe 3). Les résultats du séquençage de l'ARNr 16S, transmis sur le site internet de génome Québec, ont été alignés puis comparés avec la banque de données de NCBI avec le logiciel BLAST afin de trouver les espèces bactériennes avec les séquences les plus similaires.

2.3 Les bibliothèques et les amorces du SELEX

2.3.1 Réception des bibliothèques et de leurs amorces

Les bibliothèques (MC003_lib) ont été synthétisées par Biocorp DNA inc. Elles comprennent 50 nucléotides aléatoires au milieu et des extrémités choisies de 18 nucléotides pour l'hybridation des amorces avec un T_m de 50-65°C. Chaque bibliothèque possède des amorces sens et anti-sens connues (voir annexe 3) qui ont été également synthétisées par Biocorp DNA inc. Lors de leur arrivée, les amorces ont été suspendues à 100 μM avec de l'eau milli-Q.

2.3.2 Purification des amorces

Cette étape vise à s'assurer que les amorces possèdent le moins d'impuretés pouvant affecter le SELEX entier. 100 μL des amorces à 100 μM ont été ajoutées avec 100 μL de tampon de chargement pour gel dénaturant (voir annexe 2) dans un tube Eppendorf 1,5 mL, puis vortexées 10 secondes. Les amorces, 200 μL au total, ont été chargées dans un gel de poly-acrylamide dénaturant 15% avec une pipette de 200 μL . Le gel a migré à 500 V, pendant 1h30. Le gel a été démonté, les vitres retirées, et le gel enveloppé entre deux pellicules de plastique. L'ADN a été observé par « ombrage aux

UV » en plaçant une plaque TLC (Whatman) sous le gel et en l'exposant avec une lampe UV. Les bandes foncées, correspondant aux amorces, ont été découpées avec une lame de rasoir et placées dans des nouveaux tubes 1,5 mL. 500µL de tampon d'éluion (voir annexe 2) ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été mis en rotation pendant 12 heures. Les 500 µL du tampon d'éluion ont été placés dans des nouveaux tubes 1,5 mL, précipités (voir section 2.3.3), puis suspendus à 20 µM avec de l'eau milli-Q.

2.3.3 Précipitation

Cette étape de précipitation a été utilisée après chaque éluion de l'ADN dans un gel, permettant de se débarrasser des impuretés. Dans un tube 1,5 mL, pour 1 volume de produit à précipiter, 0,1 volume de NaCl 3M a été ajouté et vortexé 10 secondes. Ensuite, 2,2 volumes d'éthanol 100% ont été ajoutés et vortexés 10 secondes. Les tubes ont été gardés à -80°C pendant 2 heures, puis centrifugés (LegendMicro21, de Thermo Fisher Scientific), à 21 000 g 20 minutes, à 4°C. Le surnageant a été retiré et l'ADN a été lavé avec 500 µL d'éthanol 70%. Le tube a été centrifugé à nouveau 5 minutes, puis le surnageant a été retiré et l'ADN séché pendant 2 heures à 23°C.

2.3.4 Optimisation de la température d'appariement des amorces

Les températures d'appariement des amorces ont été testées pour chacune des librairies. Pour chaque librairie, il y a une préparation de huit tubes PCR contenant 0,5 µM des amorces sens et anti-sens, 50 unités/mL de polymérase (*OneTaq* DNA polymerase, de NEB), des dNTP (deoxynucleotide Solution Mix, de NEB) à 0,5 mM, du tampon de PCR à 1x (*Standard Taq* buffer, de NEB) et une dilution de la librairie à 100 pM dans un volume total de 25 µL. Une PCR à gradient de température durant l'étape d'appariement a été faite au thermocycleur (T100 Thermal Cycler, de Bio-Rad), allant de 45°C à 65°C, avec les huit tubes PCR. La PCR commence avec 3 minutes à 95°C.

Puis la PCR fait 30 cycles à 30 secondes à 95°C, 30 secondes pour la température d'hybridation (gradient de 45°C à 65°C), et 30 secondes à 72°C. Après les 30 cycles, il y a une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Chaque tube PCR a été mélangé avec 25 µL de tampon de chargement pour gel d'agarose, et puis migré 45 minutes sur un gel d'agarose 2% à 120 V. Le gel a été observé au bromure d'éthidium ou au GelRed™ avec des UV au Geldoc™XR+, de Bio-Rad).

2.3.5 Tester le nombre de cycles de l'aPCR

Des dilutions de 1 : 2, 1 :5 et 1 :10 des produits optimaux de la PCR des librairies ont été faites dans de l'eau milli-Q. Ensuite, huit tubes ont été préparés pour chacune des dilutions, contenant 0,5 µM de l'amorce sens uniquement (MC001_F) et 1 µL de la dilution, le tout dans un volume total de 25 µL. Les temps de la PCR et les concentrations des solutions ont été ceux en 2.3.4, mais avec des cycles variables de; 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 22 cycles. Les résultats ont été observés sur un gel d'agarose 2% comme en 2.2.4

2.4 Le SELEX

2.4.1 La première sélection

2.4.1.1 Préparation d'une librairie

300 µL de la librairie a été mélangé, dans un tube 1,5 mL, avec 400 µL de tampon de liaison 2X (voir annexe 2). Le tube a été chauffé à 95°C 5 minutes, puis refroidi 10 minutes sur glace. Le tube a été laissé 20 minutes à la température pièce avant de commencer les sélections (Li *et al.*, 2010).

2.4.1.2 La sélection négative

Une culture de 3 mL de bactérie, dont la souche dépend de la génération du SELEX (voir annexe 4), ont été placés dans un tube 1,5 mL et centrifugés à 8000 g 2 minutes. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé en le resuspendant dans 700 µL de tampon de liaison 1X (voir annexe 2). Le tube a été à nouveau centrifugé, le surnageant a été jeté et le culot a été suspendu dans 700 µL de tampon de liaison 1X. Les 700 µL du tube contenant la culture suspendue ont été transférés avec le tube 1,5 mL de la librairie préparée, donnant un volume total de 1400µL. Ensuite, le tube de 1400 µL a été mis en rotation à 21°C pendant 1 heure afin de laisser les oligonucléotides qui ne sont pas spécifiques lier les bactéries. Finalement, le tube a été centrifugé 2 minutes à 8000 g. Le surnageant, contenant les oligonucléotides qui n'ont pas liés les bactéries, a été conservé pour la sélection positive (voir figure 1.9).

2.4.1.3 La sélection positive

Quelques millilitres de la souche *M. aeruginosa* 13, en incubation depuis environ 2 semaines, ont été transférés dans un tube falcon 15 mL sous une hotte biologique. La DO 750 nm a été déterminé au spectrophotomètre (nanodrop 2000c, ThermoScientific). Afin de toujours avoir une DO définie, le volume total de la souche transférée est toujours 500 µL divisés par sa DO 750 nm. Ces étapes ont été répétées pour la souche *M. aeruginosa* 18 et *M. aeruginosa* NIES-298, puis les 3 souches ont été transféré dans un même tube. Le culot a été lavé deux fois en centrifugeant à 8000 g pour 2 minutes, puis en jetant le surnageant. Lors du deuxième lavage, le culot a été suspendu dans 700 µL de tampon de liaison 1X (voir annexe 2). Après les lavages, le culot a été suspendu avec le 1400 µL provenant du surnageant de la sélection négative précédente, ceci afin de permettre l'interaction entre les aptamères potentiels et les cyanobactéries. Le tube a été mis en rotation à 21°C pendant 1 heure. Ensuite, pour jeter les oligonucléotides n'ayant pas lié, le tube a été centrifugé 2 minutes à 8000 g. Le surnageant a été jeté, tandis que le culot a été lavé et suspendu dans 700 µL de tampon de liaison. À nouveau, le tube a été centrifugé 2 minutes à 8000 g et le surnageant jeté. Afin de récupérer les oligonucléotides ayant liés, le culot a été

suspendu dans 200 μL d'urée 8 M et chauffé à 95°C pendant 5 minutes. Le tube a été immédiatement centrifugé et le 200 μL du surnageant a été retiré et précipité (voir 2.3.3). À la fin de la précipitation, le culot a été suspendu dans 100 μL d'eau milli-Q.

2.4.1.4 La PCR

Une PCR d'un volume total de 1000 μL a été faite pour pouvoir amplifier les oligonucléotides sélectionnés en 2.4.1.2 et en 2.4.1.3, contenant 0,5 μM des deux amorces de la librairie et le 100 μL de la suspension des sélections à une dilution de 1 :10 (voir 2.2.4 pour les conditions de la PCR). Cette PCR permet également d'éliminer l'ADN génomique provenant de la lyse des cultures utilisées lors des sélections. Le volume total a été séparé dans 10 tubes à PCR contenant 100 μL chacun. Après l'amplification, le contenu des 10 tubes à PCR a été combiné et conservé à -20°C comme la génération 1.

2.4.2 Les générations suivantes

2.4.2.1 Production de simple brin par aPCR

Avec le produit de PCR précédent, la génération 1, une PCR asymétrique (aPCR) de 150 μL a été faite dans six tubes contenant 25 μL chacun. Cette aPCR contient 0,5 μM de l'amorce sens MC001_F et une dilution de 1 :10 de la génération 1 (voir 2.2.5 pour les conditions de l'aPCR). Chaque tube a un nombre de cycles différents ; 0, 8, 10, 12, 14 et 16 cycles. Les résultats ont été observés sur gel d'agarose 2%. Ensuite, une autre aPCR de 200 μL a été divisée dans quatre tubes contenant 50 μL , faite avec le nombre optimal de cycles observés pour la librairie de cette génération, dans les mêmes conditions.

2.4.2.2 Purification du simple brin

Le 200 μL d'aPCR combiné a été mélangé avec 40 μL de tampon de chargement 6X pour gel de polyacrylamide natif (annexe 2) puis migré sur un gel de polyacrylamide natif 6% avec un marqueur de 88 nt, à 4°C, pendant 1h30, à 400 V. Les bandes

foncées, correspondant au simple brin de 88 nt, ont été découpées (voir 2.3.2), éluées, précipitées (voir 2.3.3) et suspendues dans 700 uL de tampon de liaison.

2.4.2.3 Les sélections négatives et positives

Les sélections négatives et les sélections positives pour les autres générations ont été réalisées de la même façon que pour la première génération (voir 2.3.1). Seulement les bactéries utilisées lors de la sélection négative ont été variées (voir annexe 4), ainsi que le volume utilisé de 700 µL au lieu de 1400 µL. Les cultures des sélections positives ont été un mélange des souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18 et *M. aeruginosa* NIES-298.

2.4.2.4 La PCR

Même méthode de PCR que la première génération, avec 25 cycles. Cependant, seulement 200 µL de PCR, quatre tubes avec 50 µL, a été fait au lieu de 1000 µL. La dilution de la PCR avec les sélections précipitées et suspendues dans 100 µL est donc de 1 :2. Après la PCR les quatre tubes ont été combinés puis conservés à -20°C en tant que nouvelle génération. Pour continuer le SELEX avec une nouvelle génération, l'étape de production du simple brin a été recommencée à chaque fois.

2.5 Analyse du SELEX

2.5.1 Production du simple brin par aPCR et purification

Les mêmes étapes que lors de la production du simple brin du SELEX ont été faites (voir 2.3.1). Les 200 µL d'aPCR ont été faits à partir de 20 µL des 200 µL de PCR des générations à analyser. La purification a également été faite sur un gel de polyacrylamide 6% (voir 2.3.2). Le culot de la précipitation a été suspendu dans 20 µL d'eau milli-Q et quantifié au nanodrop (quantification de l'ADN simple brin). Les volumes ont été ajustés pour que chaque génération possède la même concentration d'ADN.

2.5.2 Analyse par le radio-isotope ^{32}P

2.5.2.1 Radiomarquage au ^{32}P

Pour chaque génération, 1 μL de tampon de ligation 10X (de NEB), 1 μL d'enzyme T4 polynucleotide kinase (10 unités), 0,5 μL d'ATP $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ et 7 μL du simple brin de la génération (purifiée, précipitée, et suspendue), ont été mélangés dans un tube 200 μL . Les tubes ont été chauffés à 37°C pendant 45 minutes. Un volume de 10 μL de tampon de chargement 2X pour gel de polyacrylamide dénaturant a été ajouté à chaque tube avant qu'ils soient chargés dans un gel de polyacrylamide 6% dénaturant. Le gel a été défait puis enveloppé de pellicules de plastique. Une cassette d'exposition à écran de phosphore (de Molecular dynamics) a été déposée dessus 5 minutes. La cassette a été observée avec l'appareil Typhoon FLA 9500 (de GE Healthcare). Avec une copie imprimée aux mêmes dimensions du gel, la bande de l'ADN radiomarqué a été découpée et puis éluee 12 heures dans 400 μL de tampon d'élution. Un volume de 350 μL de tampon d'élution a été transféré dans un nouveau tube 1,5 mL après l'élution.

2.5.2.2 L'affinité des générations envers *M. aeruginosa*

Un volume de 350 μL de tampon de liaison 2X a été ajouté dans les tubes 1,5 mL contenant le 350 μL d'élution des bandes radiomarquées. Ensuite, la méthode de sélection positive a été appliquée (2.4.1.4). Un culot de bactéries des souches *M. aeruginosa* NIES a été suspendu avec le volume total de 700 μL des générations radiomarquées. Les tubes ont été mis en rotation pendant 1 heure, puis centrifugés à 8000g 2 minutes. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et le culot suspendu dans 700 μL de tampon de liaison. À nouveau, les tubes ont été centrifugés, le surnageant transféré, et le culot suspendu dans 200 μL d'eau milli-Q.

2.5.2.3 Quantification du ^{32}P

Pour chaque génération, 20 μL des surnageant et du culot ont été mis avec 5 mL de liquide à scintillation (Cytoscint) dans des tubes à scintillation de 10 mL. Les tubes ont ensuite été scannés au compteur à scintillation avec le protocole pour le ^{32}P .

2.5.3 Analyse avec la fluorescéine

2.5.3.1 Production du simple brin fluorescent

Voir 2.5.1 pour l'aPCR, mais avec l'amorce sens marquée à la fluorescéine. Le gel a été observé au Typhoon FLA 9500 avec le protocole de la fluorescence. Les bandes fluorescentes ont été découpées du gel et placées dans des nouveaux tubes 1,5 mL avec 700 μL de tampon. Après 12 heures de rotation, le tampon d'éluion a été retiré puis 25 μL ont été mis dans une plaque de 96 puits à fond plat (Corning inc.). La lecture de la plaque a été faite avec une liseuse de plaques Infinite M1000 Pro (TECAN), avec le protocole de la fluorescence. Dépendamment des résultats, la concentration a été ajustée pour que chaque génération ait une même quantité de fluorescence dans un volume total de 700 μL .

2.5.3.2 L'affinité des générations envers *M. aeruginosa*

La méthode de sélection positive a été appliquée (2.4.1.3). Le volume total de 700 μL des tubes a servi à suspendre un culot de bactéries des souches *M. aeruginosa*. Après la sélection, le culot de bactéries a été suspendu dans 200 μL d'eau milli-Q.

2.5.3.3 Quantification de la fluorescence

Un volume de 100 μL de tous les surnageants et des culots de chaque génération a été placé dans une plaque de 96 puits à fond plat et scannée au fluorimètre par la liseuse de plaques Infinite M1000 Pro. Le fluorimètre émet à 494 nm et capture un spectre d'émission de 512 nm. Toute la manipulation a été faite en évitant l'exposition à la

lumière forte en utilisant du papier d'aluminium pour couvrir les échantillons. Les témoins négatifs étaient le mélange des trois souches *M. aeruginosa* sans les générations de SELEX. Les témoins positifs, permettant de créer un gradient des concentrations, étaient des dilutions connues des amorces fluorescentes MC001_F à 5 μM , 0,5 μM et 0,1 μM .

2.5.4 Séquençage haut débit

Les générations 3, 6 et 9 du SELEX par aPCR purifié ont été amplifiées par PCR (voir condition en 2.3.1), puis 5 μL ont été envoyés au centre NANUQ. Les échantillons ont été séquencés par un « spike » dans la méthode miSeq de Illumina, permettant le séquençage à haut débit des générations (plusieurs milliers de séquences). Une fois les résultats reçus, les séquences ont été classées par similitude et les deux extrémités de 18 nucléotides servant aux amorces ont été enlevées. Ces données ont ensuite été analysées en groupant les séquences similaires et en les comparant avec les séquences des amorces.

3 RÉSULTATS

3.1 Croissance et identification des souches

Pour connaître le milieu de croissance optimal, entre le milieu Z8, CB ou BG-11, de la souche *M. aeruginosa* NIES-298, des dilutions ont été fait en récupérant le plus de biomasse possible de la souche et en le suspendant dans un volume total de 2, 5 ou 10 fois plus grand de milieu de culture. Les incubations ont été faites en triplicata. Une croissance est considérée lorsque le milieu de la souche devient vert, de manière qualitative. La souche est considérée morte lorsqu'elle devient blanchâtre. Le tableau 3.1 montre qualitativement que le milieu CB avec une dilution de 1 :2 est le plus efficace pour la croissance de *M. aeruginosa* NIES-298. Effectivement, dans ces conditions, la croissance de *M. aeruginosa* NIES-298 a produit une couleur verte lors des trois essais, tandis que dans les autres conditions la souche mourrait et devenait blanchâtre.

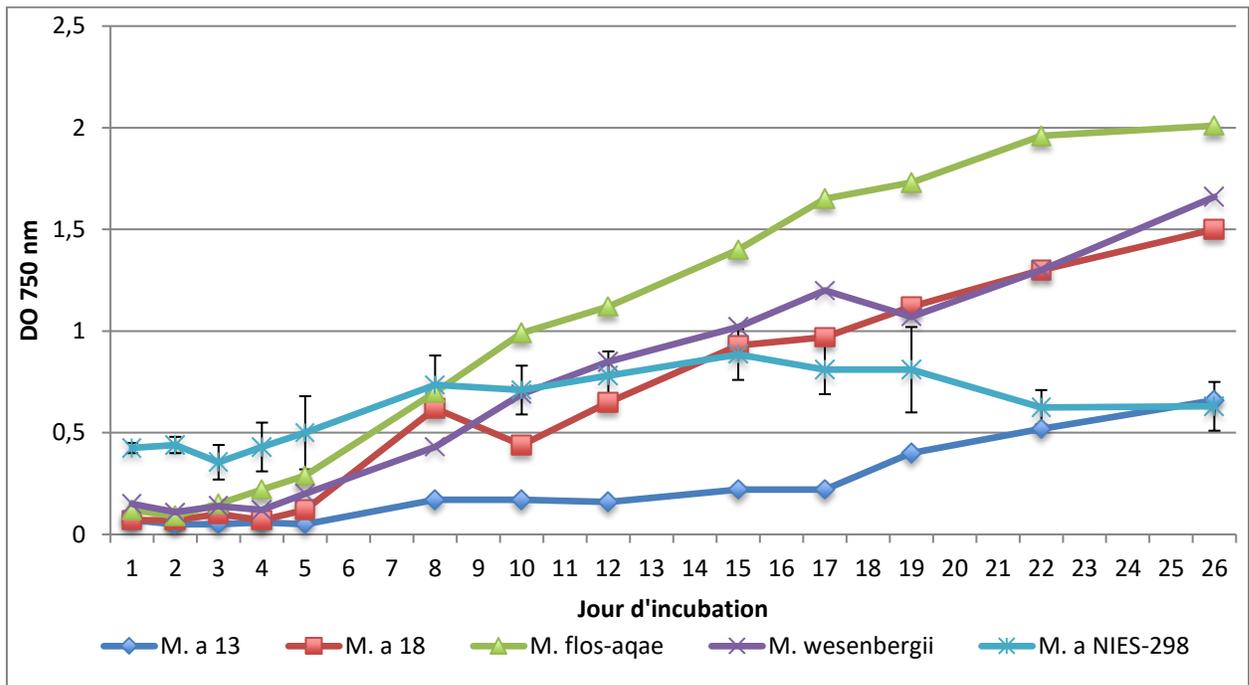
Tableau 3.1 Croissance de la souche *M. aeruginosa* NIES-298 selon son milieu suspendu et sa dilution.

Milieu de culture	Dilution	Croissance après 2 semaines
Z8	1 :10	0/3
	1 :5	0/3
	1 :2	0/3
CB	1 :10	0/3
	1 :5	0/3
	1 :2	3/3
BG-11	1 :10	0/3
	1 :5	0/3
	1 :2	0/3

Légende : Croissance après deux semaines; le nombre de souches en triplicata qui ont eu une croissance.

Les souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii* peuvent croître dans un milieu Z8 après être suspendues dans un ratio 1 :20, comme on peut le voir dans le tableau 3.2. La DO 750 nm de ces souches augmentent pendant les 25 jours d'incubation. Cependant, *M. aeruginosa* NIES-298 est suspendue dans un ratio de 1 :2 de milieu CB. La DO 750 nm augmente pendant 14 jours d'incubation, puis elle redescend.

Tableau 3.2 : DO 750 nm des souches *Microcystis* sur 25 jours d'incubation.



Les souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii* ont été suspendues à une DO 750 nm d'environ 0,01 (dilution 1 :20) dans du milieu Z8, tandis que la souche *M. aeruginosa* NIES-298 est suspendue dans une dilution 1 :2, environ à une DO 750 nm de 0,45 (dilution 1 :2), dans du milieu CB et l'expérience est faite en duplicata pour *M. aeruginosa* NIES-298 seulement. Les conditions d'incubation sont décrites dans le matériel et méthode (voir 2.1.1).

Les souches des cyanobactéries que nous avons en laboratoire: *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii* et *M. aeruginosa* NIES-298 ont été identifiées phénotypiquement par microscopie au laboratoire de David Bird et puis ont été nommées selon cette identification. Seulement *M. aeruginosa* NIES-298, provient de Microbial Culture Collection (National Institute for Environmental Studies). L'identification au microscope n'est cependant pas parfaite, il peut être difficile de différencier deux espèces proches quand leurs colonies se ressemblent. Afin de minimiser le risque d'avoir une souche mal identifiée, nous avons analysé une région très conservée de l'ARNr 16S au sein des cyanobactéries. Les clones ont été envoyés en duplicata à Nanuq avec les amorces T7 et SP6 (voir annexe 3). L'amplification du fragment de l'ARNr 16S de 782 pb est spécifique aux cyanobactéries, ce qui explique

pourquoi le contrôle négatif avec une souche *E. coli* ne donne pas un fragment de cette taille, mais que nos cyanobactéries amplifient ce fragment (voir figure 3.1). Effectivement, la similarité de l'ARNr 16S est conservée au sein d'une même espèce (Janssen, 2006).

M. aeruginosa NIES-843 est l'une des seules espèces du genre *Microcystis* à avoir son génome entier de séquencé (incluant donc l'ARNr 16S). Ceci peut expliquer pourquoi toutes nos souches *Microcystis* sont plus similaires à *M. aeruginosa* NIES-843 spécifiquement, et non à des espèces de *Microcystis* plus précises. L'ARNr 16S de notre souche *M. flos-aquae* est similaire à 90% avec celui de *M. aeruginosa* NIES-843 de NCBI, comparé à 98% de similarité pour nos souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. wesenbergii* et *M. aeruginosa* NIES-298. De plus, nos souches identifiées *M. wesenbergii* et *M. flos-aquae* ont autant de similarité avec *M. aeruginosa* NIES-843 de NCBI qu'avec respectivement *M. wesenbergii* de NCBI et *M. flos-aquae* UWOCC C3 de NCBI (moins de 1% de différence). De plus, le 89% de similarité de l'ARNr 16S avec *M. flos-aquae* UWOCC C3 est bas comparé aux autres souches *Microcystis* qui ont au moins 98% de similarité. Il est possible que l'identification par microscope soit erroné pour *M. wesenbergii* et *M. flos-aquae* ou qu'il y a eu une contamination croisée durant l'incubation et pendant les manipulations d'identification de leur ARNr 16S. Cependant, il est possible que les résultats de la souche *M. flos-aquae* proviennent de la mauvaise performance du séquençage. Effectivement, il y avait beaucoup de « N », c'est-à-dire de nucléotides non identifiés, lors du séquençage de l'ARNr 16S de *M. flos-aquae*, 9,40% de la séquence complètement. Ce séquençage devrait être refait afin d'avoir des meilleurs résultats et moins de « N ». Bref, l'identification par ARNr 16S confirme l'espèce de nos souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18 et *M. aeruginosa* NIES-298, sans toutefois avoir la certitude sur l'espèce pour les souches identifiées *M. wesenbergii* et *M. flos-aquae*.

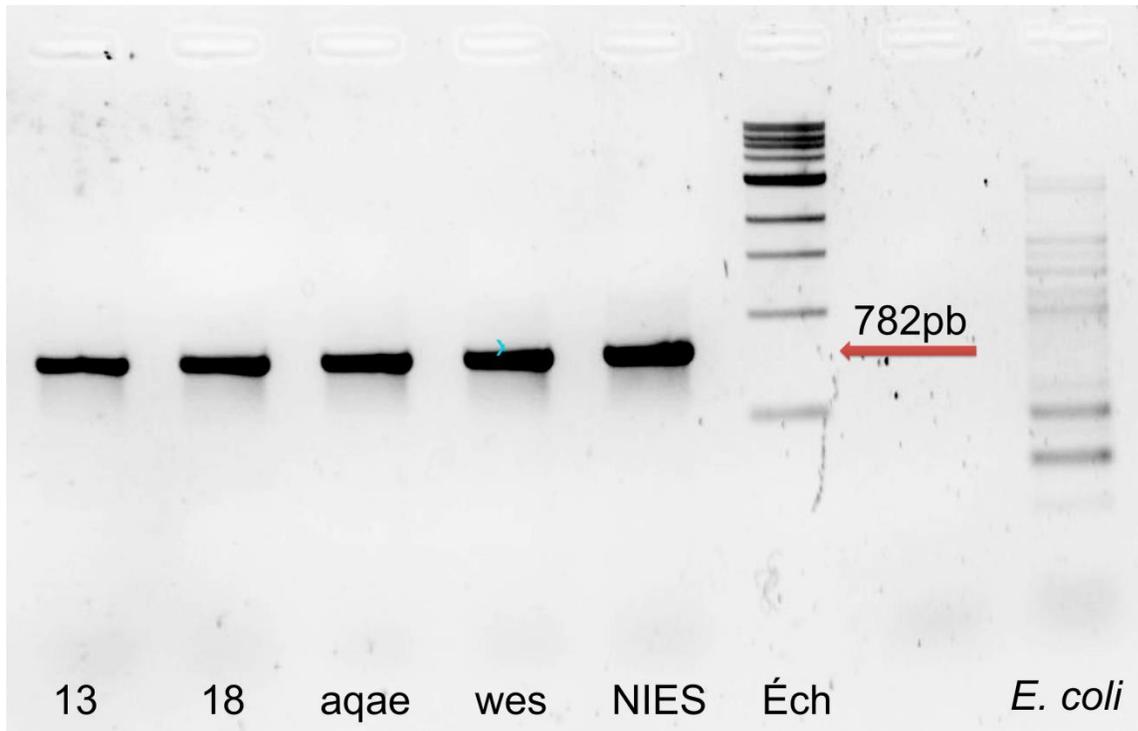


Figure 3 1. PCR de l'ARNr 16S des souches cyanobactériennes.

Migration sur un gel d'agarose 2% de 7 μ l de produits de PCR. *E. coli* est un contrôle négatif donnant des fragments non-spécifiques. Légende : 13; *M. aeruginosa* 13, 18; *M. aeruginosa* 18, aqae; *M. flos-aquae*, wes; *M. wesenbergii*, NIES; *M. aeruginosa* NIES-298, *E. coli*; *Escherichia coli*. Éch; échelle moléculaire 1 kb plus DNA ladder de Fermentas.

Tableau 3.3 Comparaison de l'ARNr 16S des souches avec la banque NCBI.

Nom de la souche identifié au microscope	% de « N » de la séquence comparée	Les souches avec la plus haute similarité de l'ARNr 16S	Pourcentage de similarité
<i>M. aeruginosa</i> 13	1,33%	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843	98%
		<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	91%
		<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437	90%
<i>M. aeruginosa</i> 18	1,03%	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843	98%
		<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437	90%
		<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	90%
<i>M. flos-aquae</i>	9,40%	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843	90%
		<i>M. flos-aquae</i> UWOC C3	89%
		<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437	87%
		<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	86%
<i>M. wesenbergii</i>	1,00%	<i>M. wesenbergii</i>	98%
		<i>M. aeruginosa</i> NIES-843	98%
		<i>Stanieria cyanosphaera</i> PCC 7437	90%

		<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	91%
<i>M. aeruginosa</i> NIES-298	1,02%	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843	98%
		<i>Stanieria cyanospaera</i> PCC 7437	90%
		<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	90%

Les noms des souches identifiées au microscope sont les noms des souches reçues du laboratoire de David Bird ou du National Institute for Environmental Studies pour *M. aeruginosa* NIES-298. Le pourcentage de « N » est par rapport au nombre de nucléotides inconnus lors du séquençage. La souche avec la plus haute similarité de l'ARN est trouvée par blast avec la banque de données NCBI.

M. aeruginosa NIES-843 est l'une des seules espèces du genre *Microcystis* à avoir son génome entier de séquencé (incluant donc l'ARNr 16S). Ceci peut expliquer pourquoi toutes nos souches *Microcystis* sont le plus similaires à *M. aeruginosa* NIES-843 spécifiquement, et non à des espèces de *Microcystis* plus précises. L'ARNr 16S de *M. flos-aquae* est similaire à 90% avec celui de *M. aeruginosa* NIES-843, comparé à 98% de similarité pour *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. wesenbergii* et *M. aeruginosa* NIES-298. Ceci peut être expliqué par le fait que *M. flos-aquae* est une espèce autre que *M. aeruginosa*. Effectivement, la similarité de l'ARNr 16S est plus conservée au sein d'une même espèce qu'au sein d'un même genre (Janssen, 2006).

Les souches identifiées *M. wesenbergii* et *M. flos-aquae* ont autant de similarité avec *M. aeruginosa* NIES-843 de NCBI qu'avec respectivement *M. wesenbergii* de NCBI et *M. flos-aquae* UWOCC C3 de NCBI (moins de 1% de différence). De plus, le 89% de similarité de l'ARNr 16S avec *M. flos-aquae* UWOCC C3 est bas comparé aux autres souches *Microcystis* qui ont au moins 98% de similarité. Il est possible que l'identification par microscope soit erronée pour *M. wesenbergii* et *M. flos-aquae* ou qu'il y a eu une contamination croisée durant l'incubation et pendant les manipulations d'identification de leur ARNr 16S. Cependant, il est également possible que la souche *M. flos-aquae* soit similaire à *M. aeruginosa* NIES-843 à cause de la mauvaise

performance du séquençage. Effectivement, il y avait beaucoup de « N », c'est-à-dire de nucléotides non identifiés, lors du séquençage de l'ARNr 16S de *M. flos-aquae*, 9,40% de la séquence complètement. Bref, l'identification par ARNr 16S confirme que les souches sont bien du genre *Microcystis* comme on le croyait, sans toutefois avoir la certitude sur l'espèce pour les souches identifiées *M. wesenbergii* et *M. flos-aquae*.

3.2 Optimisation du SELEX

3.2.1 Mise au point de l'amplification par PCR et par aPCR

La mise au point de la PCR a été effectuée en faisant varier uniquement la température d'hybridation des amorces lors de l'amplification de la librairie MC003. Il est possible de constater (voir figure 3.2 A) qu'il n'y a pas de très grandes variations entre les bandes PCR obtenues pour les différentes températures.

Des aPCR avec différents nombres de cycles ont été effectués en utilisant le résultat d'une amplification PCR sur MC003 diluée 1 :10 (voir figure 3.2 B). Chaque puits chargé par le produit d'aPCR montre une bande à 86 paires de base, soit la longueur des oligonucléotides de MC003_lib. Il est possible de constater qu'il y a une apparition graduelle d'une bande sous celle de 86 paires de base au fur et à mesure de l'augmentation du nombre de cycle, mais dont l'intensité semble se stabiliser à 16 cycles. C'est également après 16 cycles que la distinction entre les deux bandes se fait de moins en moins bien, ce qui semble indiquer que l'amplification du brin sens a plafonné. Le nombre de cycles d'aPCR optimal est déterminé selon celui qui donne à la fois une bonne quantité de produits, tout en ne créant pas d'artéfacts par une trop grande amplification. Effectivement, l'aPCR amplifie le brin sens de manière linéaire, tandis que les artéfacts peuvent être amplifiés exponentiellement. En conséquence, 14 cycles d'aPCR ont été retenus pour l'amplification du simple brin, afin de s'assurer un minimum d'artéfacts tout en maximisant la quantité de simples brins produite.

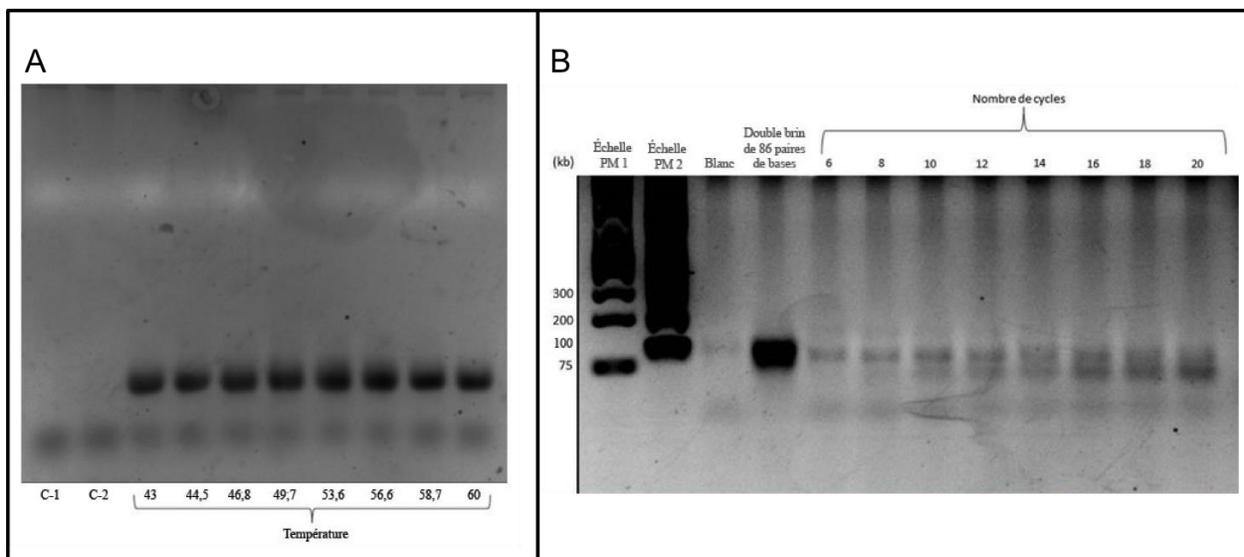


Figure 3.2 : Détermination des conditions de températures optimales d'appariement des amorces et du nombre de cycles optimal pour l'amplification par aPCR.

A) Migration sur un gel d'agarose 2% de 7 μ l de la librairie MC003_lib amplifiés avec les amorces MC001_F et MC002_R, ainsi que la Taq Hotstart Qiagen, pendant 25 cycles d'amplification par PCR. Les températures indiquées sont celles lors de l'appariement des amorces et sont en °C. Le puits C-1 contient un témoin négatif ayant subi le même nombre de cycles que les échantillons et ayant toutes les mêmes composantes que ceux-ci sauf la matrice d'ADN, MC003_lib. Le témoin négatif C-2 contient tous les mêmes éléments que les échantillons, mais il n'a subi aucune amplification. B) Une aPCR effectuée avec 1/10 du volume d'une PCR sur MC003-lib tel qu'en (A) et uniquement avec l'amorce sens MC001_F. Chaque puits a été chargé avec 7 μ l de produit et la température d'appariement des amorces choisi est de 50°C. Échelle PM 1 : 1 kb plus DNA ladder de Fermentas; Échelle PM 2 : Quick-load 100 bp DNA ladder de NEB

3.2.2 Mise au point de la quantification

La souche *M. aeruginosa* 13 émet des spectres lumineux sous un laser de 543 nm au microscope confocal (voir figure 3.3). La figure montre un groupement de bactéries lié avec leurs substances polymériques extracellulaires (EPS). Le spectre émis par *M. aeruginosa* 13 est proche du pic d'émission de la fluorescéine de 513 nm.

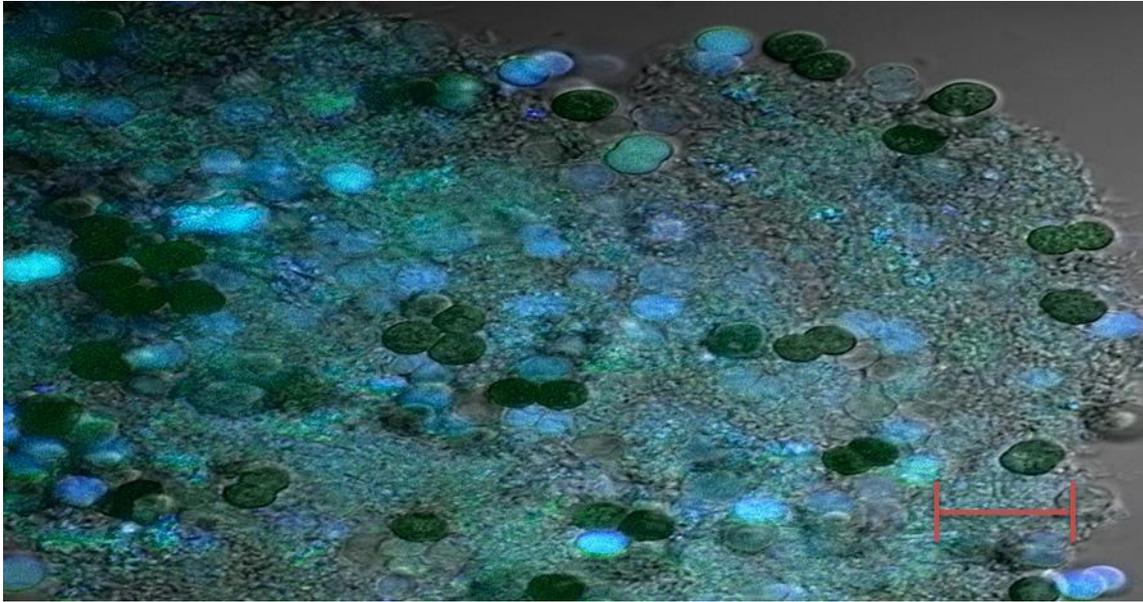


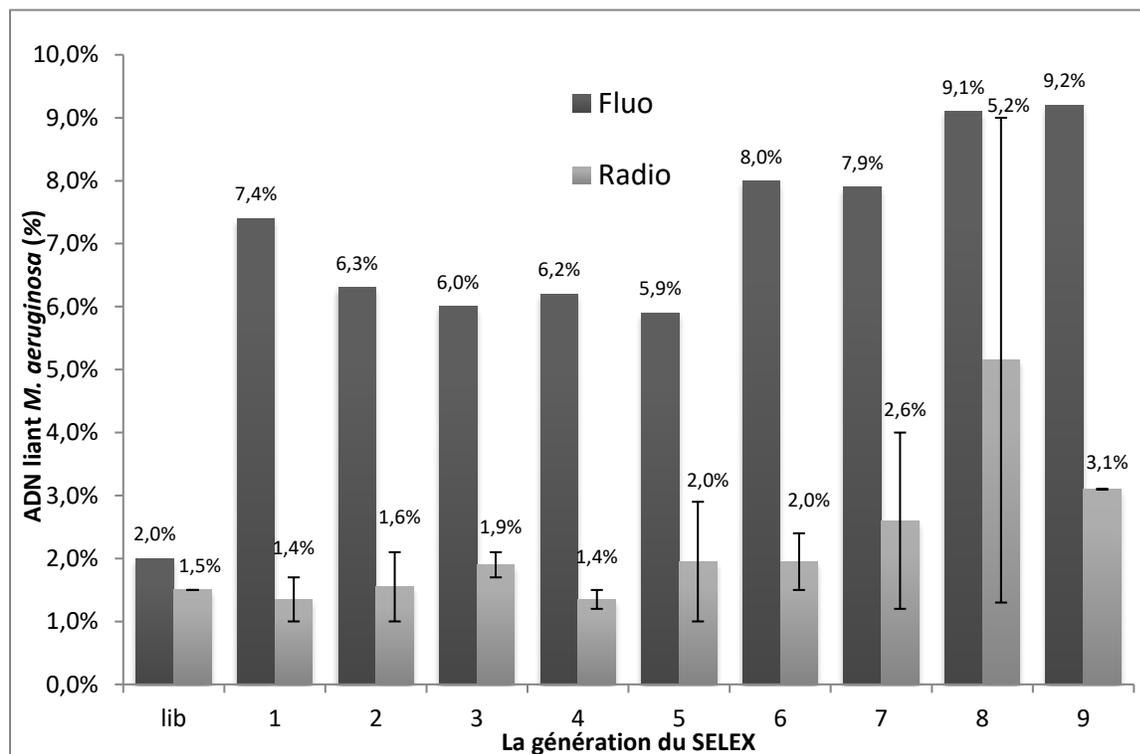
Figure 3.3 Photographie de *M. aeruginosa* au microscope confocal

Image de la souche *M. aeruginosa* 13 prise sous un microscope confocal, diluée à une DO 750 nm de 0,05, et fixés dans du PFA 0,5%. Le pic d'absorption de l'image est de 543 nm. Échelle = 10 μ m.

Analyser le SELEX avec la fluorescéine donne des résultats plus élevés pour chaque génération du SELEX que lors d'une analyse avec l'isotope ^{32}P , entre 3 à 5 fois plus d'ADN liant les générations (voir figure 3.4). Le contrôle avec la librairie d'oligonucléotides initiale donne 2% de liaison pour l'analyse par fluorescéine, tandis que le résultat est de 1.5% pour l'analyse au ^{32}P .

Dans la figure 3.4, la quantité d'ADN liant notre cible, les souches *M. aeruginosa*, quantifié à la fluorescence, passe de 2,0%, pour la librairie initiale, à 9,2%, pour la génération 9. Avec la quantification par radioactivité, l'ADN liant passe de 1,4% pour la librairie initiale, à 3,1% à la génération 9.

Figure 3.4 Pourcentage d'ADN des générations du SELEX par aPCR liant *M. aeruginosa* quantifié par fluorescence ou par radioactivité.



Les expériences ont été faites une seule fois pour la quantification par fluorescence et pour la quantification par ^{32}P de la librairie initiale et de la génération 9. Les expériences de la quantification par ^{32}P des générations 1 à 8 sont dupliquées. Les bactéries utilisées sont un mélange des souches *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18 et *M. aeruginosa* NIES-298. Légende : lib; librairie initiale, fluo; quantification par fluorescence détectée, radio; quantification par l'isotope radioactif ^{32}P .

3.3 Séquençage du SELEX

Lors du séquençage Hiseq de Nanuq (annexe 6) des générations 3, 6 et 9 du SELEX par aPCR, le nombre de lectures diminue lorsque les générations de SELEX augmentent (voir tableau 3.4). De plus, le pourcentage des lectures avec la taille recherchée de 50 nt diminue également de la génération 3 à 6 (de 71,5% à 23,0%), et de 6 à 9 (23,0% à 4,3%). Les séquences deviennent également plus diverses à la génération 9 qu'à la génération 3 et 6, où chaque séquence n'est présente qu'en une seule copie, sauf pour les artéfacts ressemblant aux amorces utilisées durant la PCR (voir annexe 5).

Tableau 3.4 Résumé du séquençage Hiseq du SELEX par aPCR des générations 3, 6 et 9.

La génération	Lectures totales	Lectures de 50 nt	Pourcentage des lectures de 50 nt
3	13 756	9836	71,5%
6	9734	2235	23,0%
9	5417	235	4,3%

Les générations de SELEX et 3, 6 et 9 ont été envoyées à NANUQ après avoir été amplifiées par PCR. La colonne lectures représente le nombre d'oligonucléotides qui ont pu être séquencés parmi les échantillons envoyés à NANUQ. La colonne lectures de séquences de 50 nt représente le nombre d'oligonucléotides séquencé avec une taille de 50 nt, ce qui correspond à la taille de la région aléatoire de notre librairie du SELEX. Le pourcentage des séquences de 50 nt est trouvé pour chaque génération avec la formule : $Lectures\ de\ 50nt / Lectures\ totales = \% \text{ des lectures de } 50nt$

4 DISCUSSION

4.1 Les souches *Microcystis*

Le tableau 3.2 montre que la souche *M. aeruginosa* NIES-298 demande du temps et de l'entretien avec des conditions précises pour sa croissance. Effectivement, cette souche pousse dans un milieu CB, comme ce qui est recommandé par le producteur (National Institute for Environmental Studies), mais ne pousse pas dans un milieu Z8 ou BG-11. La différence majeure entre les milieux (voir annexe 1) est la présence de la vitamine b12 dans le milieu CB, essentielle pour certaines cyanobactéries (Helliwell *et al.*, 2016). *M. aeruginosa* NIES-298 doit être suspendue dans un ratio de 1:2 de milieu de culture, contrairement aux autres souches cyanobactériennes du laboratoire qui peuvent être suspendues dans un ratio de 1:20. Ceci peut être expliqué par le fait que de suspendre *M. aeruginosa* NIES-298 dilue les EPS servant à sa survie et à sa flottabilité (Reynolds *et al.*, 1987), créant un stress important.

La souche *M. aeruginosa* NIES-298 demande d'être suspendue (ratio 1:2) à chaque deux semaines où elle atteint son pic d'absorbance à 750 nm (graphique 3.1). Cependant, son pic d'absorption est très variable d'une incubation à une autre, ainsi que la quantité d'EPS produit. Ceci peut influencer le niveau d'impuretés d'une génération du SELEX à une autre. C'est également le cas pour les autres cyanobactéries du laboratoire, *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii*, mais leurs absorbances à 750 nm continuent d'augmenter après 25 jours d'incubation et elles peuvent être suspendues dans un ratio 1 :20 avec du milieu Z8, qui était le milieu de culture utilisé précédemment dans le laboratoire du Dr. Bird et donc auquel elles étaient adaptées.

4.2 Le SELEX avec la cible *M. aeruginosa*

4.2.1 La quantification

Notre stratégie de quantification utilisé était d'optimisé la quantification avec la fluorescéine, dû à sa simplicité, puis de tester la radioactivité par comparaison. Dans le

tableau 3.4 sur la quantification, la quantité d'ADN liant notre cible, un mélange de *M. aeruginosa* 13, *M. aeruginosa* 18 et *M. aeruginosa* NIES-298, a augmenté de 7,2% par fluorescence et de 1,7% par radioactivité entre l'ADN de la librairie initiale à la génération 9. Cependant, lorsqu'on regarde des publications de SELEX qui mènent à des aptamères prouvés, le pourcentage d'ADN liant la cible augmente plus entre les générations. Par exemple, les résultats d'un SELEX avec comme cible des cellules cancéreuses avaient 20 fois plus d'ADN liant entre la génération 1 et 12 (Civit *et al.*, 2017). Cependant, certains ont également réussi à sélectionner un aptamère avec un SELEX dont la différence d'ADN liant leur cible entre les générations était plus subtile.

Le fait que la quantification avec la fluorescence donne des résultats 3 à 5 fois plus élevés qu'avec la radioactivité peut montrer une incertitude dans les méthodes. Il faudrait faire plus de répliques pour connaître l'incertitude. Effectivement, les cyanobactéries produisent des pigments d'une variété de spectres lumineux, incluant la chlorophylle a, qui a des pics d'absorbance de 400 nm et de 600 nm. Le microscope confocal (voir figure 3.4) confirme que nos souches produisent de tels pigments. De plus, on peut voir que nos souches cyanobactériennes produisent plus de pigments comparativement à la fluorescéine de nos oligonucléotides. La quantité du pigment varie, dans une même souche, d'un échantillon à un autre.

La fluorescéine a un pic d'absorption de 512 nm, et *M. aeruginosa* produit un spectre qui sature le microscope confocal avec un laser ayant un pic d'absorption de 543 nm, et cela avec une dilution de la souche de 0,05 de DO 750 nm (voir figure 3.4). Lors de la quantification par fluorescéine, nos souches pourraient laisser des pigments résiduels provenant suite à l'éluion des aptamères et venir fausser les résultats. Un plus grand nombre de répétitions de nos résultats pourrait confirmer ceci. L'utilisation d'un marqueur émettant un spectre avec un pic loin des pics de chlorophylle (400 nm et 600 nm) pourrait être une alternative pour améliorer la quantification. Effectivement, *M. aeruginosa* produit des EPS qui permettent aux cellules de se coller entre elles en amas. Ceci diminue la visibilité de possibles oligonucléotides, couplés avec la fluorescéine, pouvant avoir lié *M. aeruginosa*.

Les EPS, produits par *M. aeruginosa*, ont un rôle important dans la flottabilité et compliquent le SELEX. Lors d'une centrifugation, il y a une séparation de *M. aeruginosa*, allant dans le culot, et des EPS, allant en partie à la surface du surnageant. Durant le SELEX, cette séparation peut entraîner la perte de nombreux aptamères potentiels qui seront jetés avec le surnageant. De plus, puisque les EPS se retrouvent normalement autour des amas de cellules de *M. aeruginosa* (voir figure 3.3), les EPS peuvent empêcher la liaison des aptamères aux ligands qui se trouvent sur la membrane cellulaire. Une solution à tester serait de sélectionner des aptamères avec uniquement l'EPS de *M. aeruginosa*, plutôt qu'avec les bactéries entières, puisqu'on s'attend également à ce que dans les lacs, les EPS soient présents autour des amas de bactéries. Cependant, la production de ces EPS n'est pas identique d'une culture à l'autre, rendant difficile la reproductibilité nécessaire pour la sélection d'aptamères qui les lieraient.

En principe, au contraire de la fluorescence, la radioactivité n'est pas sujette à un bruit de fond de *M. aeruginosa* et devrait être une bonne alternative. Cependant, même si la quantification par radioactivité montre une augmentation d'ADN liant à partir de la génération 5, les barres d'erreur sont trop grandes (voir figure 3.4). Il est donc probable que cet enrichissement soit causé par des séquences qui s'amplifient mieux par aPCR que par des potentiels aptamères. Le séquençage de nos générations nous aidera à confirmer cette possibilité.

4.2.2 Le séquençage

Nous pensons que l'amplification par aPCR avec une purification sur gel nous permettrait d'enrichir des aptamères plutôt que des artéfacts. Cependant, lors du séquençage à haut débit du SELEX, le nombre de lectures diminue avec l'augmentation des générations (voir tableau 3.4); 13756 lectures pour la génération 3, 9734 lectures pour la génération 6, et 5417 lectures pour la génération 9. Effectivement, d'une génération de SELEX à l'autre, il était de plus en plus difficile de les amplifier par PCR et d'avoir de belles bandes après une migration sur gel. De plus, le nombre de séquences avec la taille attendue de 50 nt diminue aussi avec l'augmentation des

générations, passant de 71.5% des oligonucléotides à la génération 3, à 23% à la génération 6, puis à 4.3% à la génération 9. Également, l'enrichissement diminue à la génération 9 puisque chaque séquence est unique contrairement à nos attentes où que ça devrait augmenter. Nous pensons que la cause principale de ces résultats est que les artéfacts augmentent à chaque génération du SELEX. Si on regarde le séquençage, il y a effectivement plus d'artéfacts comportant les amorces; 5'- CGA TCC GAC TTC TGA ACT -3' et 5'- TCA CAG TGC AAG CGT AGC -3', à la génération 9 (voir annexe 5 pour des exemples).

Ces artéfacts peuvent être produits durant l'étape d'amplification par PCR. À la figure 3.2 A, lors de la mise au point de la température d'appariement des amorces durant l'amplification par PCR, il n'y a pas de différence notable des bandes pour un intervalle de 43°C à 60°C. Cependant, tout un protocole de SELEX consiste à de nombreuses amplifications par PCR pour passer d'une génération à une autre, ce qui peut potentiellement créer de nombreux artéfacts qui s'accumulent d'une génération à une autre. Afin de minimiser l'amplification d'artéfacts, nous avons évité les basses températures d'appariement. Nous avons également évité les hautes températures, supérieures aux T_m de nos amorces, afin d'avoir une amplification efficace pour tous les oligonucléotides sélectionnés, ce qui est particulièrement important pour les quelques premières générations du SELEX. De plus, le T_m de MC001 et MC002 sont respectivement de 55.02°C et 55.55°C, et nous avons choisi une température d'appariement qui se situe 5 °C sous le T_m , soit 50 °C. Il aurait été peut-être préférable d'augmenter graduellement la température d'appariement après chaque génération pour contrer l'accumulation d'artéfacts tout en ayant une bonne efficacité d'amplification pour les toutes premières générations du SELEX. Cependant, pour optimiser cette idée il faudrait le tester sur un SELEX entier, ce qui peut être une piste envisageable.

La production de simple brin d'ADN durant l'amplification par aPCR produit également des artéfacts. Ceci peut être expliqué par le fait qu'une aPCR produit des artéfacts de manière exponentielles tandis qu'elle produit le simple brin voulu de manière linéaire. Les artéfacts s'accumulent donc de plus en plus après chaque génération du SELEX, rendant de plus en plus difficile l'amplification. Contrôler le nombre maximal de cycles d'aPCR est un moyen de limiter la production d'artéfacts (voir figure 3.2 B). Également,

l'inclusion d'une étape de purification de l'ADN double brin, avant l'aPCR, aurait permis de se débarrasser des produits de PCR trop court.

Une autre cause possible de nos résultats inattendus du séquençage est que le SELEX était trop stringent, ne permettant pas aux potentiels aptamères d'être sélectionnés et de se démarquer des autres séquences et des artéfacts. Nous avons essayé d'être moins stringent en utilisant du tampon de liaison, environ six fois plus concentré en minéraux qu'un lac du Québec, pour favoriser la liaison. Nous avons aussi fait le SELEX à la température de la pièce, sans chauffer, tandis que dans un lac la température de l'eau peut être plus élevée, rendant les liaisons des aptamères plus difficiles. Cependant, nous avons fait des sélections négatives dès le premier cycle du SELEX afin d'être plus spécifique à *M. aeruginosa*. Cette stratégie a été choisie pour permettre d'avoir le plus rapidement des aptamères spécifiques. Cependant, certains protocoles de SELEX sur cellules recommandent plutôt d'introduire les sélections négatives à la génération 4 seulement (Sefah *et al.*, 2010). Effectivement, les premières générations sont les plus importantes pour avoir des aptamères, tandis que les générations suivantes servent de raffinement en augmentant la spécificité et en éliminant les aptamères avec une plus petite affinité au ligand. À l'inverse, la sélection négative dès le premier cycle élimine potentiellement des aptamères, présent en une seule copie dans notre librairie initiale, qui n'auront donc jamais la chance d'être amplifiés.

5 CONCLUSION

Nous n'avons pas réussi à optimiser la quantification de l'ADN lors du SELEX. Effectivement, nos souches cyanobactériennes rendent difficile le suivi efficace du SELEX puisque ces souches produisent des pigments qui interfèrent avec la quantification par fluorescence. Au contraire, nos souches n'affectent pas la quantification par radioactivité qui s'avère être un meilleur choix en l'occurrence. Cependant, les résultats de la quantification par radioactivité ne correspondent pas à nos attentes d'un SELEX, où normalement la quantité d'ADN pouvant lier la cible augmente rapidement, et il faudrait plus de réplicas pour connaître l'incertitude. De plus, nos souches prennent longtemps à croître, deux à trois semaines, avec une grande variabilité d'une incubation à une autre, entre autres sur la production de EPS. Ceci ajoute de nombreuses variables non contrôlées au protocole du SELEX et rend la reproductibilité difficile. Faire une preuve de concept de nos méthodes avec une souche bactérienne plus facile et plus constante, comme *E. coli* serait une bonne idée pour optimiser et contrôler les variables. Notamment, des aptamères contre la souche *E. coli* O157:H7 peuvent servir au biosenseur afin d'évaluer la contamination de cette bactérie pathogène. Cela nous permettrait également d'optimiser plus facilement la quantification par radioactivité. D'autres méthodes de quantification peuvent être testées, avec, par exemple, des photopigments qui émettent à 700 nm, loin des pics d'absorbance de la chlorophylle. De plus, il sera plus facile d'avoir des réplicas et de tester ainsi les incertitudes sur nos méthodes.

De plus, nous n'avons pas trouvé une méthode optimale d'amplifier et de purifier les oligonucléotides du SELEX. Nos résultats montrent que le SELEX par aPCR, pour trouver des aptamères de *M. aeruginosa*, crée un nombre d'artéfacts qui augmente et s'enrichit d'une amplification à une autre, et cela plus vite que nos aptamères qui diminuent en enrichissement. Il est possible d'utiliser des méthodes moins stringentes durant le SELEX pour laisser des meilleures chances aux aptamères de compétitionner contre les artéfacts. Par exemple, éviter les sélections négatives durant les premières générations aurait pu permettre un enrichissement des aptamères. D'autres méthodes de purification peuvent être essayées pour minimiser la présence d'artéfacts produits

par aPCR dans le SELEX. Par exemple, la filtration par billes de Sephadex sépare rapidement, sans étape supplémentaire, l'ADN selon leur taille en ralentissant les plus petits fragments dans le filtre. Également, la purification sur gel dénaturant, lorsque l'amorce anti-sens possède un groupement PEG, permet d'extraire spécifiquement le brin sens puisqu'il migrera plus loin dans le gel que son complémentaire qui possède le PEG. La purification par groupement PEG a notamment été déjà testée dans l'optimisation d'un cycle du SELEX et semble être envisageable pour un prochain SELEX. D'autres méthodes que l'amplification par aPCR pour produire de l'ADN simple brin pourrait potentiellement baisser le nombre d'artéfacts. Par exemple, l'enzyme lambda exonucléase peut dégrader le brin complémentaire avec un monophosphate en 5' et ne produire ainsi que du simple brin. Une autre idée potentielle serait d'utiliser des nickases pouvant couper en plusieurs fragments uniquement le brin complémentaire et produire ainsi du simple brin. Il est également possible de coupler le brin anti-sens avec une biotine puis de l'immobiliser avec des billes de streptavidine.

Le protocole entier d'un SELEX par aPCR a été quantifié puis a été séquencé. Cependant, nous n'avons pas réussi le deuxième objectif de trouver des séquences d'aptamères pour pouvoir les tester sur *M. aeruginosa*. Effectivement, le séquençage, à la génération 9, ne montre qu'une seule copie de chaque séquence, donc aucun enrichissement autre que ceux étant des artéfacts (voir annexe 5), montrant ainsi que le SELEX a pas fonctionné. Effectivement, nous nous attendions normalement à trouver de plus en plus de copies de certaines séquences plus que les générations augmentent. Les difficultés mentionnées lors de l'optimisation du SELEX sont probablement la cause principale. Des méthodes de purifications et de quantifications optimisées, pour un suivi entre chaque génération, aurait pu nous permettre de trouver des séquences qui se démarquent des autres à la génération 9.

Il y a également d'autres alternatives que les aptamères pour lier spécifiquement *M. aeruginosa* au biosenseur. L'utilisation de bactériophages spécifiques a notamment été montrée efficace pour la détection d'*E. coli* O157:H7 lorsque couplé à notre biosenseur (Tripathi *et al.*, 2012). Dans notre cas, le seul phage connu pouvant infecter *M. aeruginosa* est Ma-LMM01 et il est spécifique à la souche *M. aeruginosa* NIES-298. Cependant, il est probable que ce phage puisse lier toutes souches *M. aeruginosa* sans

pouvoir nécessairement les infecter. Nous avons déjà envisagé cette piste, mais la production de phages s'est avérée laborieuse due à la croissance difficile de nos souches et l'apparente faible réplication du phage. Toutefois, le protocole pourrait être optimisé et l'idée des phages pourrait être testée lors d'une prochaine recherche.

6 REFERENCES

- Allentoft ME, Collins M, Harker D, Haile J, Oskam CL, Hale ML, Campos PF, Samaniego JA, Gilbert MT & Willerslev E (2012) The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 279:1745.
- Berezovski M, Musheev M, Drabovich A & Krylov SN (2006) Non-SELEX selection of aptamers. *Journal of the American Chemical Society* 128(5):1410-1411.
- Chorus I & Bartram J (1999) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. *WHO*.
- Civit L, Taghdisi SM, Jonczyk A, Haßel SK, Gröber C, Blank M, Stunden HJ, Beyer M, Schultze J & Latz E (2017) Systematic evaluation of cell-SELEX enriched aptamers binding to breast cancer cells. *Biochimie* 145:53-62.
- Corkal DR & Adkins PE (2008) Canadian agriculture and water. *13th IWRA World Water Congress*. p 1-4.
- Devlin S, Meneely JP, Greer B, Greef C, Lochhead MJ & Elliott CT (2013) Next generation planar waveguide detection of microcystins in freshwater and cyanobacterial extracts, utilising a novel lysis method for portable sample preparation and analysis. *Analytica chimica acta* 769:108-113.
- Dwivedi HP, Smiley RD & Jaykus L-A (2013) Selection of DNA aptamers for capture and detection of Salmonella Typhimurium using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting. *Applied microbiology and biotechnology* 97(8):3677-3686.
- Ellington AD & Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature* 346(6287):818.
- Froment-Vedrine M (2005) L'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. *ADMINISTRATION-PARIS*- 209:19.
- Hamula CL, Peng H, Wang Z, Tyrrell GJ, Li X-F & Le XC (2016) An improved SELEX technique for selection of DNA aptamers binding to M-type 11 of Streptococcus pyogenes. *Methods* 97:51-57.
- Hastie CJ, McLauchlan HJ & Cohen P (2006) Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nature protocols* 1(2):968.
- Helliwell KE, Lawrence AD, Holzer A, Kudahl UJ, Sasso S, Kräutler B, Scanlan DJ, Warren MJ & Smith AG (2016) Cyanobacteria and eukaryotic algae use different chemical variants of vitamin B12. *Current Biology* 26(8):999-1008.
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* 72(3):1719-1728.
- Jiang L, Majumdar A, Hu W, Jaishree T, Xu W & Patel DJ (1999) Saccharide-RNA recognition in a complex formed between neomycin B and an RNA aptamer. *Structure* 7(7):817-S817.

- Johnson BN & Mutharasan R (2013) A cantilever biosensor-based assay for toxin-producing cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* using 16S rRNA. *Environmental science & technology* 47(21):12333-12341.
- Komárek J & Johansen JR (2014) Filamentous cyanobacteria. *Freshwater Algae of North America (Second Edition)*, Elsevier. p 135-235.
- Krüger G & Eloff J (1977) The influence of light intensity on the growth of different *Microcystis* isolates. *Journal of the Limnological Society of southern Africa* 3(1):21-25.
- Li Y & Nutiu R (2010) Aptamer selection method. (Google Patents).
- Liu Y, Li L & Jia R (2011) The optimum resource ratio (N: P) for the growth of *Microcystis aeruginosa* with abundant nutrients. *Procedia Environmental Sciences* 10:2134-2140.
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U & Einsele H (2000) Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *Journal of clinical microbiology* 38(2):586-590.
- Marton S, Cleto F, Krieger MA & Cardoso J (2016) Isolation of an Aptamer that Binds Specifically to *E. coli*. *PLoS One* 11(4):e0153637.
- Meriluoto J, Kincaid B, Smyth MR & Wasberg M (1998) Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 810(1-2):226-230.
- Mouret J, Odin F, Polverelli M & Cadet J (1990) Phosphorus-32 postlabeling measurement of adenine N-1-oxide in cellular DNA exposed to hydrogen peroxide. *Chemical research in toxicology* 3(2):102-110.
- Msagati TA, Siame BA & Shushu DD (2006) Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic toxicology* 78(4):382-397.
- Neumann A-C, Wang X, Niessner R & Knopp D (2016) Determination of microcystin-LR in surface water by a magnetic bead-based colorimetric immunoassay using antibody-conjugated gold nanoparticles. *Analytical Methods* 8(1):57-63.
- Ngwa F, Madramootoo C & Jabaji S (2014a) Monitoring toxigenic *Microcystis* strains in the Missisquoi bay, Quebec, by PCR targeting multiple toxic gene loci. *Environmental toxicology* 29(4):440-451.
- Ngwa FF, Madramootoo CA & Jabaji S (2014b) Comparison of cyanobacterial microcystin synthetase (mcy) E gene transcript levels, mcy E gene copies, and biomass as indicators of microcystin risk under laboratory and field conditions. *MicrobiologyOpen* 3(4):411-425.
- O'neil J, Davis T, Burford M & Gobler C (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful algae* 14:313-334.

- Ohk S, Koo O, Sen T, Yamamoto C & Bhunia A (2010) Antibody–aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *Journal of applied microbiology* 109(3):808-817.
- Paerl HW & Millie DF (1996) Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia* 35(6S):160-167.
- Pan G, Yang B, Wang D, Chen H, Tian B-h, Zhang M-l, Yuan X-z & Chen J (2011) In-lake algal bloom removal and submerged vegetation restoration using modified local soils. *Ecological Engineering* 37(2):302-308.
- Phankhajon K & Somdee T (2013) Isolation and Characterization of Algicidal Bacterium against the Toxic Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*. *Journal of Life Sciences and Technologies Vol* 1(4).
- Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Sivonen K & Lahti K (2002) Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* 466(2):213-231.
- Reynolds CS (1972) Growth, gas vacuolation and buoyancy in a natural population of a planktonic blue-green alga. *Freshwater biology* 2(2):87-106.
- Reynolds CS, Oliver RL & Walsby AE (1987) Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 21(3):379-390.
- Rong Y, Chen H, Zhou X-F, Yin C-Q, Wang B-C, Peng C-W, Liu S-P & Wang F-B (2016) Identification of an aptamer through whole cell-SELEX for targeting high metastatic liver cancers. *Oncotarget* 7(7):8282.
- Saker ML, Jungblut A-D, Neilan BA, Rawn DF & Vasconcelos VM (2005) Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 46(5):555-562.
- Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'donoghue MB & Tan W (2010) Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nature protocols* 5(6):1169.
- Speer BR (1997) Photosynthetic pigments. *UCMP Glossary (online)*. University of California, Berkeley Museum of Paleontology. Access verified April 27:2007.
- Sun W-C, Gee KR, Klaubert DH & Haugland RP (1997) Synthesis of fluorinated fluoresceins. *The Journal of Organic Chemistry* 62(19):6469-6475.
- Svobodová M, Pinto A, Nadal P & O'Sullivan C (2012) Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404(3):835-842.
- Svrcek C & Smith DW (2004) Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering and Science* 3(3):155-185.
- Tabarzad M, Kazemi B, Vahidi H, Aboofazeli R, Shahhosseini S & Nafissi-Varcheh N (2014) Challenges to design and develop of DNA aptamers for protein targets. I.

- Optimization of asymmetric PCR for generation of a single stranded DNA library. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 13(Suppl):133.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T & Neilan BA (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. *Chemistry & biology* 7(10):753-764.
- Tripathi SM, Bock WJ, Mikulic P, Chinnappan R, Ng A, Tolba M & Zourob M (2012) Long period grating based biosensor for the detection of *Escherichia coli* bacteria. *Biosensors and Bioelectronics* 35(1):308-312.
- Tuerk C & Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *science* 249(4968):505-510.
- Van der Westhuizen A & Eloff J (1985) Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* 163(1):55-59.
- Vant-Hull B, Payano-Baez A, Davis RH & Gold L (1998) The mathematics of SELEX against complex targets1. *Journal of molecular biology* 278(3):579-597.
- Whitton BA & Potts M (2012) Introduction to the cyanobacteria. *Ecology of Cyanobacteria II*, Springer. p 1-13.
- Yeh P, Yariv A & Marom E (1978) Theory of Bragg fiber. *JOSA* 68(9):1196-1201.
- Yoshida T, Nagasaki K, Takashima Y, Shirai Y, Tomaru Y, Takao Y, Sakamoto S, Hiroishi S & Ogata H (2008) Ma-LMM01 infecting toxic *Microcystis aeruginosa* illuminates diverse cyanophage genome strategies. *Journal of Bacteriology* 190(5):1762-1772.
- Zhu JP, Du S & Li X (2012) Detection of microcystin-producing *Microcystis* in Guanqiao Lake using a sandwich hybridization assay. *Canadian journal of microbiology* 58(4):442-447.

ANNEXES

Annexe 1 : Les milieux de culture

Milieu CB

Solution mère	Concentration des solutions (g/L)	Volume (ml) par litre de solution
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	150	1
KNO_3	100	1
$\beta\text{-Na}_2\text{glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	50	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40	1
Vitamine B12	1	0,001
Biotine	1	0,001
Thiamine HCl	1	0,1
Solution de métaux		1
Bicine	500	1

*Ajuster le pH du milieu à environ 9, avec HCl. Stérilisation à l'autoclave.

Solution de métaux traces du milieu CB

Composés	Concentration g/L
H_3BO_3	2.86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.222
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.390
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.049

Milieu Z8 (Kotai, 1972)

Composés	Concentration
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g/L
NaNO ₃	0.467 g/L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	59 mg/L
NH ₄ Cl	31 mg/L
Na ₂ CO ₃	0.02 g/L
FeEDTA solution	10 mL/L
Gaffronmicronutrients solution	1 mL/L

FeEDTA solution

Composé	Concentration
Solution A	
FeCl ₃	2,8 g/100 mL 1 N HCL
Solution B	
EDTANa ₂	3,9g/100 ml 0,1 N NaOH
- Ajouter 10 mL de solution A et 9,5 mL de solution B à 1 L d'eau	

Gaffronmacronutrients solution

Composé	Concentration g/L
H ₃ BO ₃	3.1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.23
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22

(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O	0.088
Co(NO₃)₂·6H₂O	0.146
VOSO₄·6H₂O	0.054
Al₂(SO₄)₃K₂SO₄·2H₂O	0.474
NiSO₄(NH₄)₂SO₄·6H₂O	0.198
Cd(NO₃)₂·4H₂O	0.154
Cr(NO₃)₃·7H₂O	0.037
Na₂WO₄·2H₂O	0.033
KBr	0.119
KI	0.083

Milieu LB

Composés	Concentration
Peptone	10 g/L
NaCl	10 g/L
Extrait de levure	5 mg/L

Annexe 2 : Les solutions

Tampon de liaison

Composés	Concentration
PBS	1x
MgCl ₂	5 mM

*Autoclaver, garder à 4°C.

Tampon d'élution

Composés	Concentration
NaCl	200 mM
Tris-Cl ; pH 7,5	10 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,01%

*Autoclaver, garder à 4°C.

Tampon de chargement 2X pour gel dénaturant

Composés	Concentration
Formamide	1x
EDTA	10 mM
Bleu de promophénol	0,05%
Xylène cyanol	0,05%

*Garder à 4°C.

Tampon de chargement 6X pour gel natif

Composés	Concentration
Sucrose	4%
Bleu de promophénol	0,05%
Xylène cyanol	0,05%

*Garder à 4°C.

Annexe 3 : Les oligonucléotides

Tableau 7.1 Noms et séquences des oligonucléotides utilisés lors des PCR

Nom	Oligonucléotides	Séquence (5'-3')
MC001_F	Amorce sens SELEX	TCACAGTGCAAGCGTAGC
MC002_R	Amorce anti-sens SELEX	GTTCAGAAGTCGGATCGG
MC003_Lib	Librairie SELEX	TCACAGTGCAAGCGTAGC-50N- CCGATCCGACTTCTGAAC
TN005_27F	Amorce sens ARNr 16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
TN006_809R	Amorce anti-sens ARNr 16S	GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA
SP6	Amorce séquençage	ATTTAGGTGACACTATAG
T7	Amorce séquençage	TAATACGACTCACTATAG

Annexe 4 : Les sélections négatives

Tableau 7.2 Les souches utilisées de la sélection négative de chaque génération du SELEX.

Génération	Souche
1	<i>Escherichia coli</i> DH5 α
2	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853
4	<i>Staphylococcus aureus</i> 812
5	<i>Methylobacterium extorquens</i>
6	<i>Escherichia coli</i> NEB#2987
7	<i>Staphylococcus aureus</i> 812
8	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
9	<i>Methylobacterium extorquens</i>

Annexe 5: Séquençage du SELEX

Tableau 7.3 Résultats du séquençage des générations 3, 6 et 9 du SELEX.

Génération	Séquence	Copies
3	AATGGTGTACATACATGTAGCGACGGGTCATTCATGTGGTGAGGTGCGGTG	2
	GGCTGTATGTGGGCCCGGGGAGCCGATGCTCGCCTATGCTCCGTGC	2
	GTTTCGTGGGACAAGTGTGGGAGTTATCGCTCTGGTGGGCGTCTCCGATGG	2
	GTATGTGTCCAACAGGGTCAGGATGGTGTGGTGTGCGGAAGTGGCTGACGG	2
	GTAGGTGTGAGGTGGGTGTGCTATCATTGCTTGGCGCTGAGTACGTGGC	2
	TGTCATAGCAAGTAGGGGCCAATGTGCCGACGGGCTGTGGCTCTCACGC	2
	AACGGTGGGTGCTGTACGGGGGAAGGACACGTGGTGTCTGGCAGAGTC	2
	ACAGGCGGTGGGAGGATAGGGCGTTTCGGGGAGGGGCCATGCGTCCGGTG	2
	AGGCGTCGGTGAGGGTGCCTTGGCGTGGAGTGTGTGGTTCGCTCC	2
	TGTGGCCGGGTGGATCCGGGCCGGTGTGCGGTGTGCAACTGGGATCGGGG	2
6	ACCGAGGGGGTGAGAGTGACGGAGTCCGGGTGCGCGTGTGTCTCATTG	2
	GTCGGCGGAAGAGGTAGTAGTAGTTGTAGCGGTAGTCTGGAGTCGCGGG	2
	GGCTGAGCGGTGGATGTGGTGTGAAGTGGTGCGGCGGACGTGGGGGTGGC	2
	ACGGGTACGAGGGGGAGTGTCTGTTGGGCTGATGGAAGTGCCGTGTC	2
	GCAGACAGGGACTGTGCGAGGGGGATCGCAGTGGCGTGCATGGTAGTGGC	2
	GGCGGTTCGGCGGGATGTTAGCCGGCACTGGGCAAGGGGGGTCTGCGCTTC	2
	CGAGGTGTCTGGGAGAAGGACAGGGGCGATAGCTGACTACGGTTCGGG	2
	GGGAAACGTGGGAGCCATGCGATAGCTGGGAAGGGGGTAGGTCCCCTGC	2
	CCCCGATTGTGGTGTG	2
	ATCCCCACAGCATGAAGAACGTGGTGCGGTGTAAAGCCATGGTTGTGCC	2
9	CGATCCGACTTCTGAACAGACCAAGTCTCT	5
	CGATCCGACTTCTGAAC	5
	CCGATCCGACTTCTGAACAGACCAAGTCTCT	3
	CCCGATCCGACTTCTGAACAGACCAAGTCTCT	2
	CCGATCCGACTTCTGAAC	2
	TCACAGTGAAGCGTAG	3
	AGCGGGGGGGCGTTTGGGG	1
	GGCAGCATCAGCGGGGACGGTGGCGTTTGGCTGATGGATGGTCTTGGCC	1
	TGACGGAGGCTGGGGGAACGCGTGTCTGGGTTTGGTGTGGTCCGTCCC	1
	CGAGGAGGCACGGGCTGACGAAGGAGGTGATCAGGCGATGGGTTGCGCC	1

Les 10 résultats avec le plus grand nombre de copies sont retenus. Les nucléotides rouges sont très similaires aux amorces MC001_F ou MC002_R.

Annexe 6: ARNr 16S des *Microcystis*.

Tableau 7.4 Séquençage de l'amplification avec les amorces TN005_27F et TN006_809R des cinq souches *Microcystis*.

souche	Séquence (5'-3')
<i>M. aeruginosa</i> 13	<p>23 aacgggat cttcggattN NNTggcggac gggtagtaa 61 cgcgtNNNNN Nctaacttca ggacggggac aacagtggga aacgactgct aataccgat 1° gtgccgcaag gtgaaacctta attggcctga agaagagctt gcgctctgatt agctagtgtg 181 tggggtaaga gcctaccaag gcgacgatca gtagctggtc tgagaggatg agcagccaca 241 ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat tttccgcaat 301 gggcgaaagc ctgacggagc aacgccgctg gaggaggaa ggtctttgga ttgtaaacct 361 cttttctcaa ggaagaagt ctgacggtae ttgaggaatc agcctcggct aactccgtgc 4° cagcagccgc ggtaatcagg gggaggcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagcgt 481 ccgaggtgg tcagccaagt ctgctgcaa atcaggttg ttaacgacct aaaggcggg 541 gaaactggca gactagagat cagtggggg agcaggaatt cccagtgtag cggtagaatg 601 cgtagagatt gggagaaca tcggtggcga aagcgtgcta ctgggctgta tctgacactc 661 agggacgaaa gctaggggag cgaaaggat tagataccc</p>
<i>M. aeruginosa</i> 18	<p>24 aacggga tcttcggatt ctagtggcg acgggtgagt 61 aacgcgNNNN NNNctaactt caggacgggg acaacagttg gaaacgactg ctaataccc 121 atgtgccgca aggtgaaacc taattggcct gaagaagagc ttgcgtctga ttagctagt 181 ggtggggtaa aggcctacca aggcacgat cagtactgg tctgagagga tgagcagcca 241 cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atttccgca 301 atgggcaaaa gcctgacgga gcaacgccgc gtgaggagg aaggtctttg gattgtaaac 361 ctcttttctc aaggaagaag ttctgacggt acttgaggaa tcagcctcgg ctaactccgt 421 gccagcagcc gcgtaatac gggggaggca agcgttatcc ggaattattg ggcgtaaagc 481 gtccgcaggt ggtcagccaa gtctgctgtc gaatcaggtt gcttaacgac ctaaaggcgg 541 tggaaactgg cagactagag agcagtaggg gtagcaggaa ttcccagtgt agcggtagaa 601 tgcgtagaga ttgggaagaa catcgtggc gaaagcgtc tactgggctg tatctgacac 661 tcagggacga aagctagggg agcgaaggg attagatacc c</p>
<i>M. flos-aquae</i>	<p>80 t caggacgggg acaacagttg gaaacgactg NNNNNaccgg 121 atatgccgca aggtgaaacc taattggcct ggagaagagc ttgcgtctga ttagctagt 181 ggtggggtaa gagcctacca aggcacNNt cagtactgg tctgagNgga tgagcagcca 241 cactgggact gagacacggc ccNgactcct acgggaggcN NNagtgggga atttccgca 301 atgggcaaaa gcctgacggn NNNNcgccgc gtgaggagg aaggtctttg gattgtaaac 361 ctcttttctc aaggaagaag ttctgacggt acttgaggaa tcagcctcgg ctaactccgt 421 gccNNNagNN NNNNtaataN NNgggaggca agcgttatcc ggaattattg ggcgtaaagc 481 gtccgNNNgt ggtcNgNNNN NtctgcNNtc aaatcNgNtt gcttaacgac ctNNNgcgg 541 tggaaactNN cagacta</p>
<i>M. wesenbergii</i>	<p>20 a gtcgacggga atcttcggat tctagtggcg gacgggtgag 61 tagcgcgtaN NNNNNctaac ttcaggacgg ggacaacagt tggaaacgac tgctaatacc 121 cgatatgccg caaggtgaaa cctaattggc ctggagaaga gcttgcgtct gattagctag 181 ttggcggggt aaaggcctac caaggcagc atcagtactt ggtctgagag gatgagcagc 241 cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaattttccg 301 caatgggca aagcctgacg gagcaacgcc gcgtgaggga ggaaggtctt tggattgtaa 361 acctcttttc tcaaggaaga agttctgacg gtacttgagg aatcagcctc ggctaactcc 421 gtgccagcag ccgcggtaat acgggggagg caagcgttat ccggaattat tgggcgtaaa 481 cgtccgcag gtggtcagcc aagtctgtcg tcaaatcagg ttgcttaacg acctaaaggc 541 ggtgaaaact ggcagactag agacagtag gggtagcagg aattcccagt gtacggtga 601 aatcgtaga gattgggaag aacatcgtg gcgaaagcgt gctactgggc tgtatctgac 661 actcagggac gaaagctag ggagcgaag ggattagata ccc</p>

<i>M. aeruginosa</i> NIES-298	20	a	gtc	gac	ggga	atcttc	ggat	tctagt	ggcg	gacgg	gtgag										
	61	taac	gcg	NNN	NNNN	ctaact	tcagg	gac	ggg	gaca	acag	tt	ggaa	cgact	gcta	atacc					
	121	gat	gtg	ccgc	aagg	tgaac	ctaatt	ggcc	tgaaga	aagag	cttgc	gtctg	attag	ctagt							
	181	tgg	tgg	ggta	agag	cctacc	aagg	cgac	ga	tcagt	agctg	gtctg	agag	gtgag	cagcc						
	241	acact	ggggc	tgag	acac	gg	cccag	actcc	tac	ggag	gc	agcag	tggg	aatt	ttcc	gc					
	301	aat	ggg	caaa	agc	ctgac	gg	agca	ac	gccg	cgtg	aggg	gag	gaag	gtctt	ggatt	gtaaa				
	361	cct	ctttt	ct	caag	ga	aa	g	ttctg	ac	gg	tact	tgag	ga	atcag	cctc	gcta	actcc			
	421	tgcc	agcag	c	gcg	gta	ata	cggg	ggag	gc	aag	cgt	tatc	cgga	attatt	ggcg	gtaa	ag			
	481	cg	tc	gcag	g	tggt	cag	cca	agt	ctg	ccgt	caaat	cag	gt	tgct	taac	ga	ccta	aagg	gc	
	541	gtg	gaa	actg	gcag	act	aga	gag	cag	tag	g	ggtag	cag	ga	attccc	ag	t	agc	gtg	aa	
	601	atg	cgt	agag	att	ggg	aa	aga	acat	cgt	gg	cgaa	ag	cgtg	ctact	gg	gct	gtat	ctg	aca	
	661	ctc	agg	gac	g	aa	gct	agg	gag	c	gaa	agg	gatt	ag	ata	c					