



**HAL**  
open science

## **Impact de la méthode d'extraction d'ADN sur l'analyse du microbiote digestif**

Sarah Guardia, Jean-Pierre Furet, François Recoquillay, Hervé Juin, Michel Lessire, Maryse Leconte, Pascale Rideaud, Carole Moreau-Vauzelle, Christele Dupont, Jean-François Guillot, et al.

### ► **To cite this version:**

Sarah Guardia, Jean-Pierre Furet, François Recoquillay, Hervé Juin, Michel Lessire, et al.. Impact de la méthode d'extraction d'ADN sur l'analyse du microbiote digestif. Réseau Nutrition et Ecosystème Microbien. Animation Transversale PHASE-MICA, Dec 2009, Toulouse, France. <hal-03366092>

**HAL Id: hal-03366092**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03366092v1>**

Submitted on 5 Oct 2021

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

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



HAL Authorization

# Impact de la méthode d'extraction d'ADN sur l'analyse du microbiote digestif

Sarah Guardia, J.-P. Furet, F. Recoquillay, H. Juin, M. Lessire, M. Leconte, P. Rideaud, C. Moreau-Vauzelle, C. Dupont, J.-F. Guillot, I. Gabriel



Unité de Recherches Avicoles

Unité d'Élevage Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours

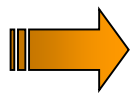
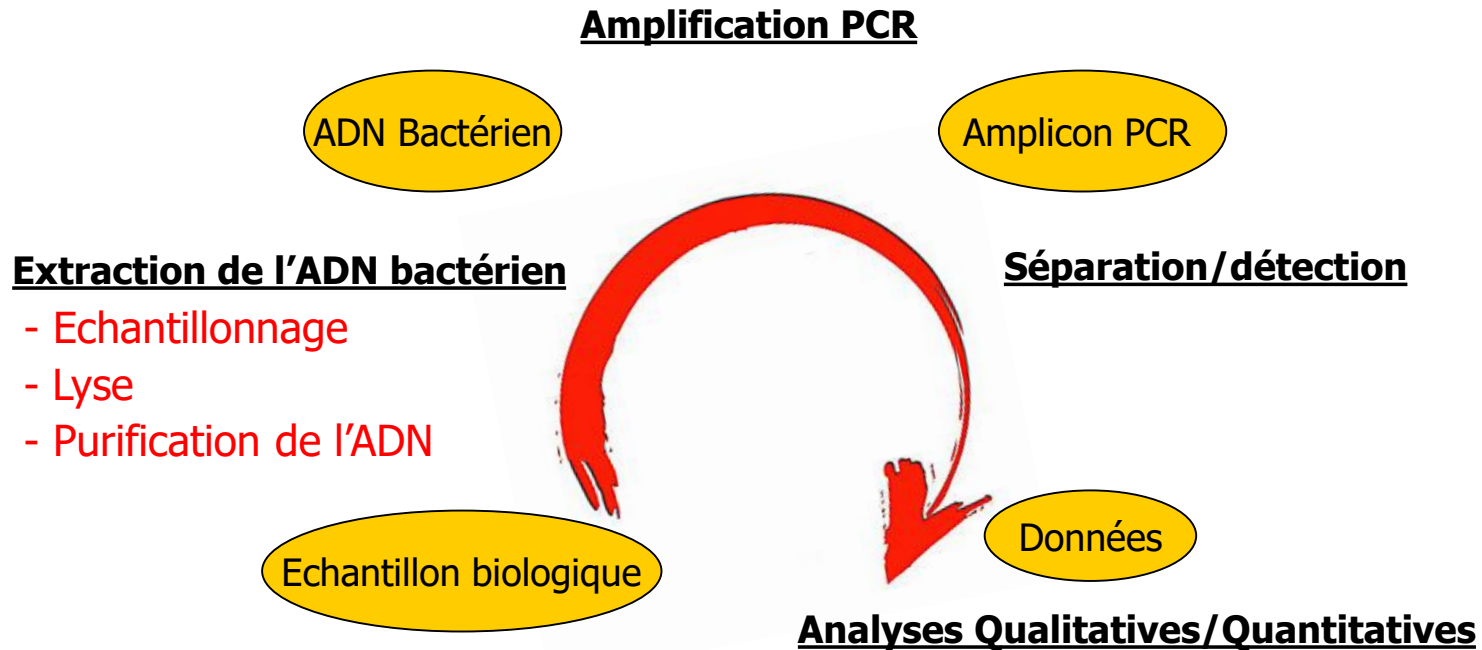
Unité d'Élevage Alternatif et Santé des Monogastriques



la phytothérapie animale titrée



# Approches moléculaires



L'extraction de l'ADN bactérien peut conduire à un biais dans la connaissance d'un microbiote

(Zoetendal *et al.*, 2001 ; Anderson *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2007)

# Extraction de l'ADN bactérien

Utilisation de nombreuses méthodes 'manuelles' et kits différents pour l'extraction de l'ADN bactérien de microbiotes digestifs

**Méthodes manuelles** : lentes  
(souvent <10 échantillon/2j)

**Kits** +/- automatisés : rapides (jusqu'à plusieurs 10<sup>aines</sup> d'échantillons/j)

## Etapes clés :



### Lyse cellulaire :

- Mécanique
  - Chimique
  - Enzymatique
- et +/- combinaisons

### Purification de l'ADN :

- Chimique (ex: chloroforme/éthanol)
  - Adsorption sur des particules de silice
  - Adsorption sur des filtres de silice
- et +/- molécules spécifiques

**Comparaison de  
2 méthodes d'extraction d'ADN pour  
l'analyse qualitative et quantitative du  
microbiote digestif du poulet**

# Echantillons Bactériens

## Echantillons

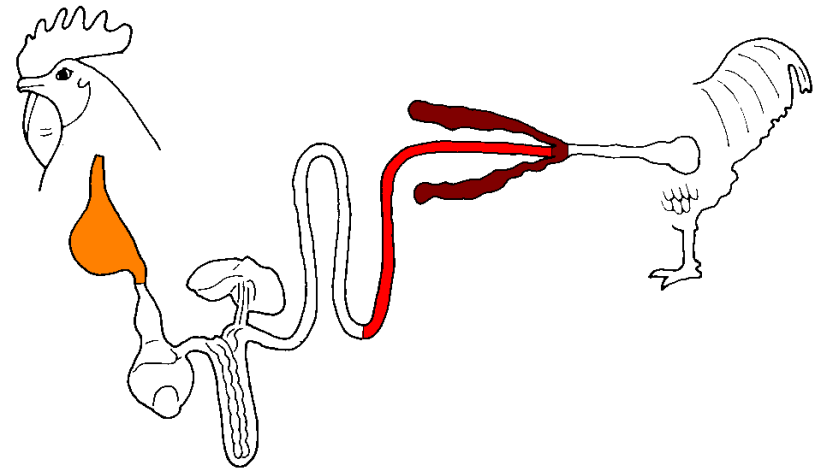
### ◆ Animaux :

- Poulets Ross PM3
- Mâles
- Agés de 1 et 6 semaines



### ◆ Localisation :

- Jabot, iléon, caeca
- Lumen et muqueuse
- 5 individus/pool



# Méthodes d'extraction de l'ADN

- **Méthodes utilisées :**

- ◆ Une méthode utilisée par de très nombreux laboratoires (rapide) : QIAamp® DNA stool (Qiagen)

Avec une étape de lyse enzymatique pour améliorer la lyse des bactéries GRAM+ (Castillo *et al.*, 2006)

- ◆ Une méthode récemment développée : G'NOME® kit (BIO 101)

Avec ajout d'une étape de lyse mécanique pour améliorer la lyse cellulaire (Furet *et al.*, 2009)

# Méthodes d'extraction de l'ADN

## QIAamp

1

### Lyse chimique / enzymatique

- Tampon (ASL)
- Lysozyme

2

### Elimination des inhibiteurs

- Tablettes Inhibitex

3

### Hydrolyse des protéines

- Protéinase K
- Tampon (AL)

4

### Purification de l'ADN

- Membrane de silice
- Ethanol
- tampons (AW1 et AW2)

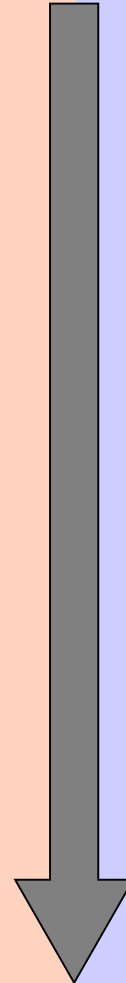
5

### Suspension de l'ADN

- Tampon (AE)

rapide

Echantillon



ADN

## G'NOME

1

### Lyse chimique

- Solution de lyse (cell lysis)

2

### Hydrolyse des protéines

- Protéinase mix

3

### Lyse mécanique

- Bead beater

4

### Elimination des inhibiteurs

- polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

5

### Précipitation de l'ADN

- Isopropanol
- H<sub>2</sub>O et salt out mix
- Ethanol

6

### Suspension de l'ADN

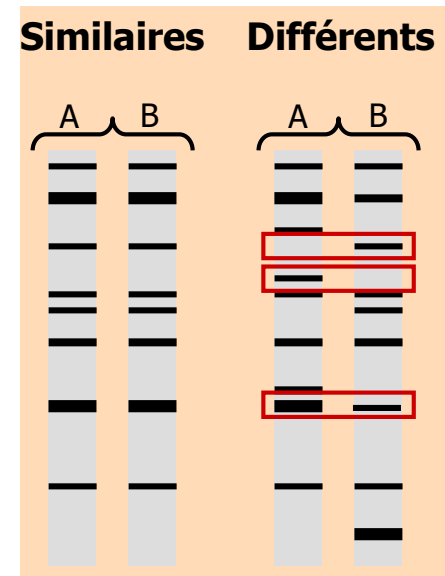
- Tampon Tris-EDTA (TE)

+ long

# Comparaison des 2 méthodes d'extraction

- **Analyse qualitative**

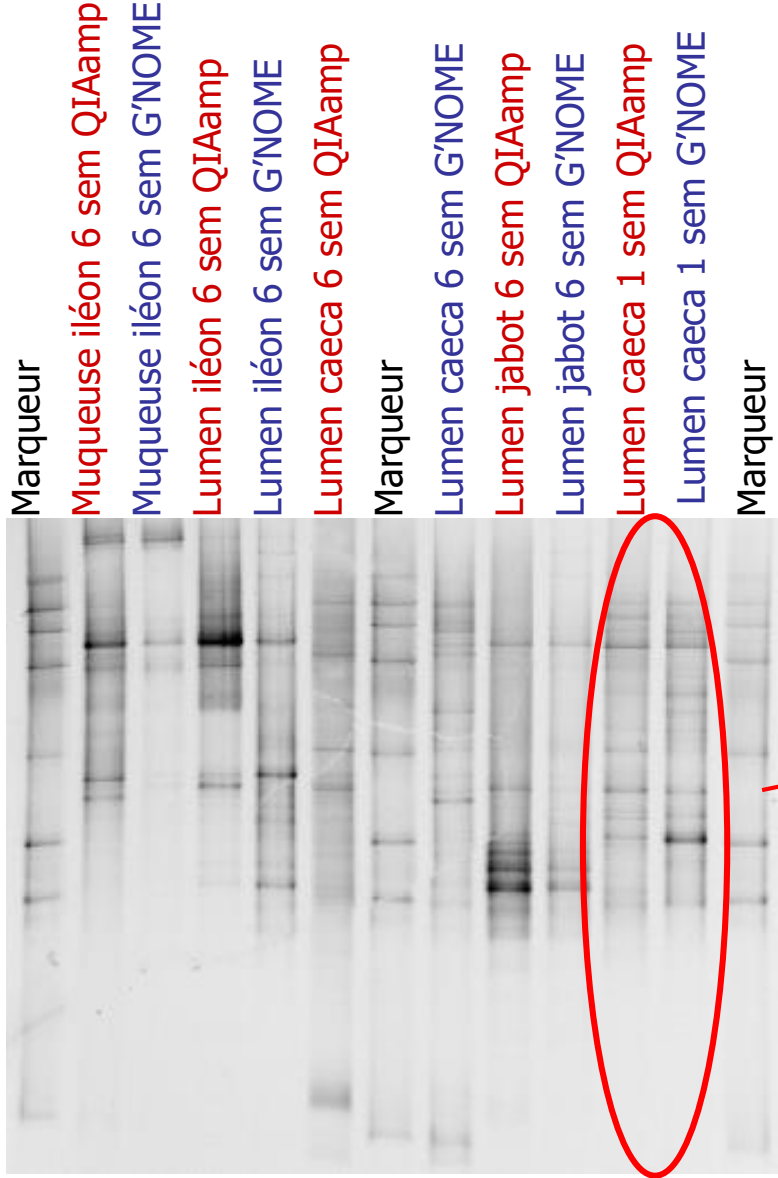
- ◆ Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE)
- ◆ Amplification avec des amorces "*all bacteria*"
- ◆ Comparaison de profils



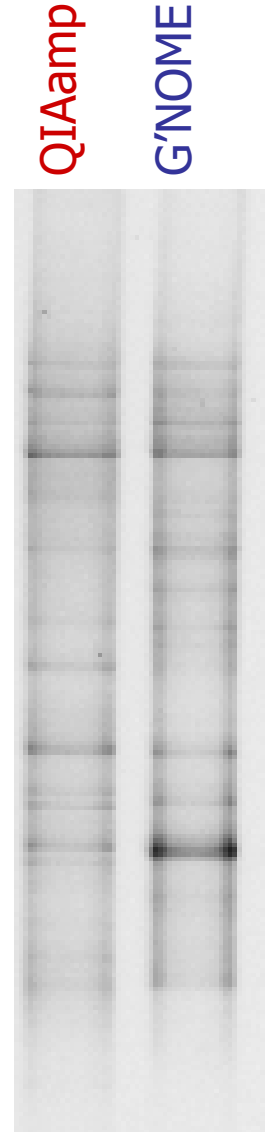
- **Analyse quantitative**

- ◆ PCR en temps réel
- ◆ Amplification avec
  - des amorces "*all bacteria*"
  - des amorces de groupe pour : *C. leptum*, *C. coccoides*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, et *E. coli*
- ◆ Quantification grâce à une gamme étalon (ADN génomique)

# Analyse qualitative (1)



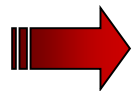
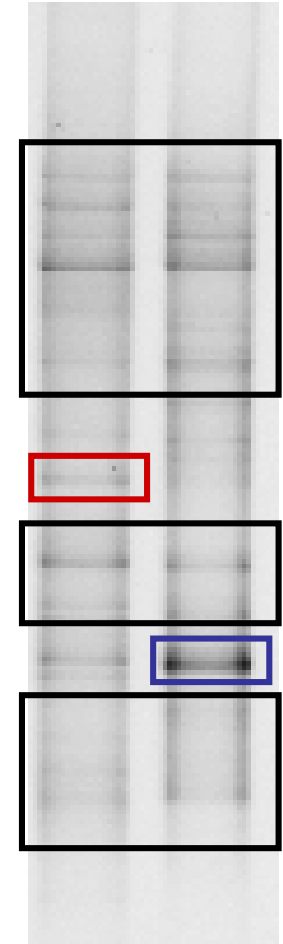
Exemple



# Analyse qualitative (2)

- La majorité des bandes est présente avec chaque méthode
- Certains amplicons sont moins intenses ou sont absents avec la méthode G'NOME
- Certains amplicons sont moins intenses ou sont absents avec la méthode QIAamp

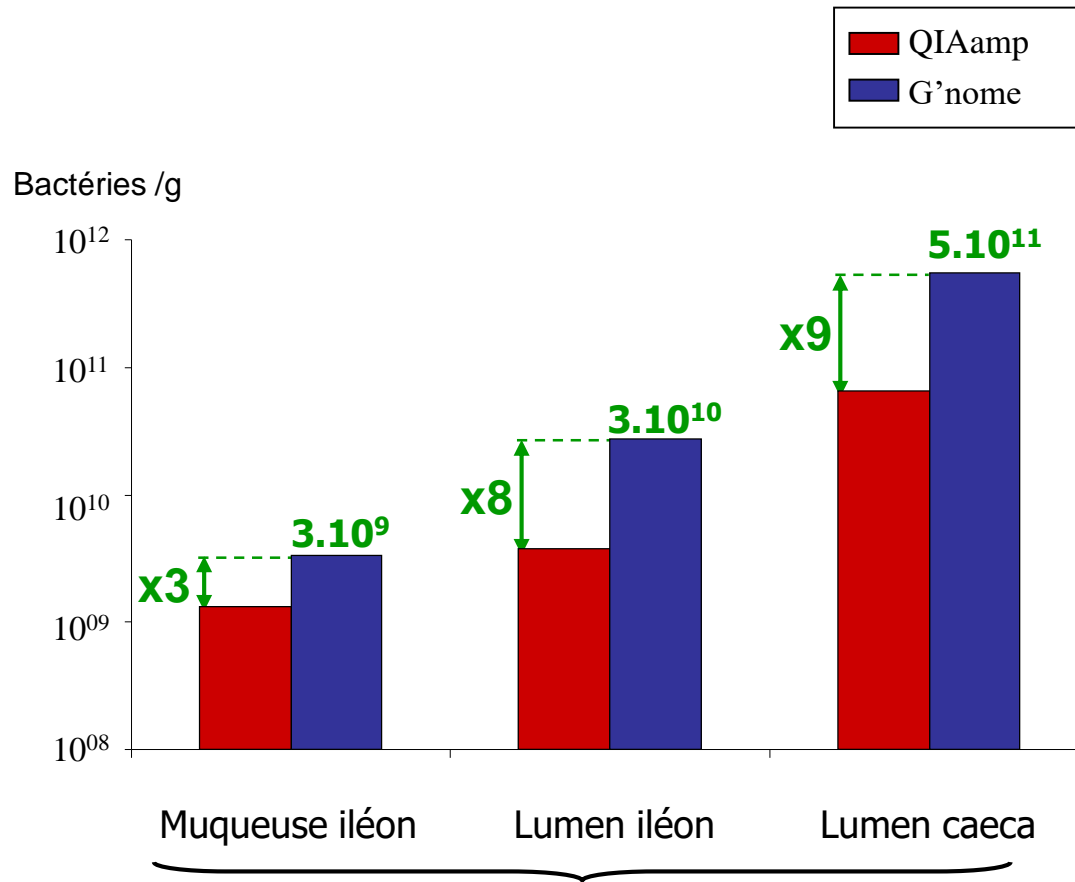
QIAamp  
G'NOME



Sélectivité de l'extraction

# Analyse quantitative (1)

- *Analyse "All bacteria"*



Poulets âgés de 6 semaines



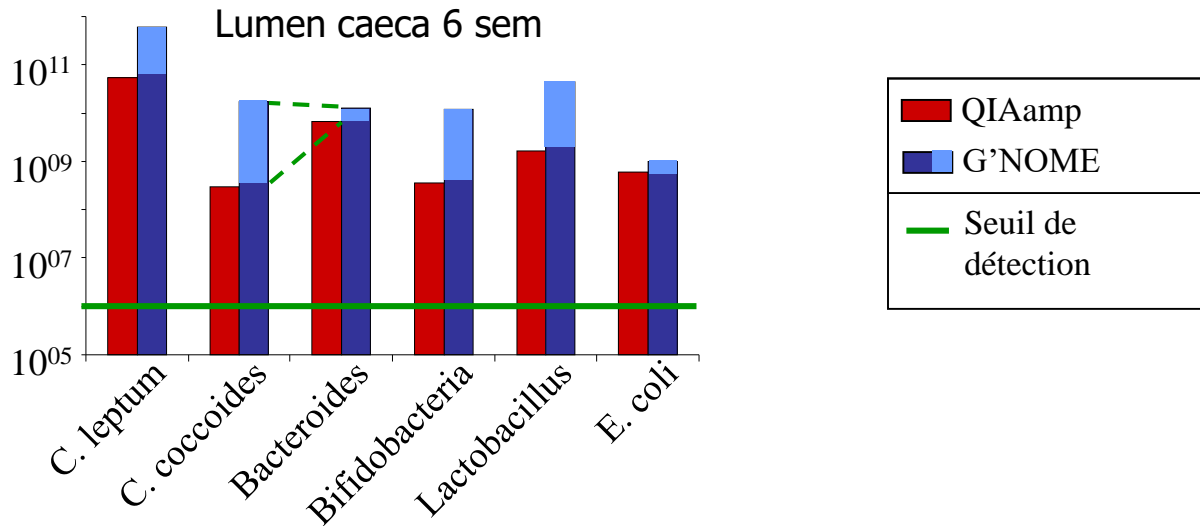
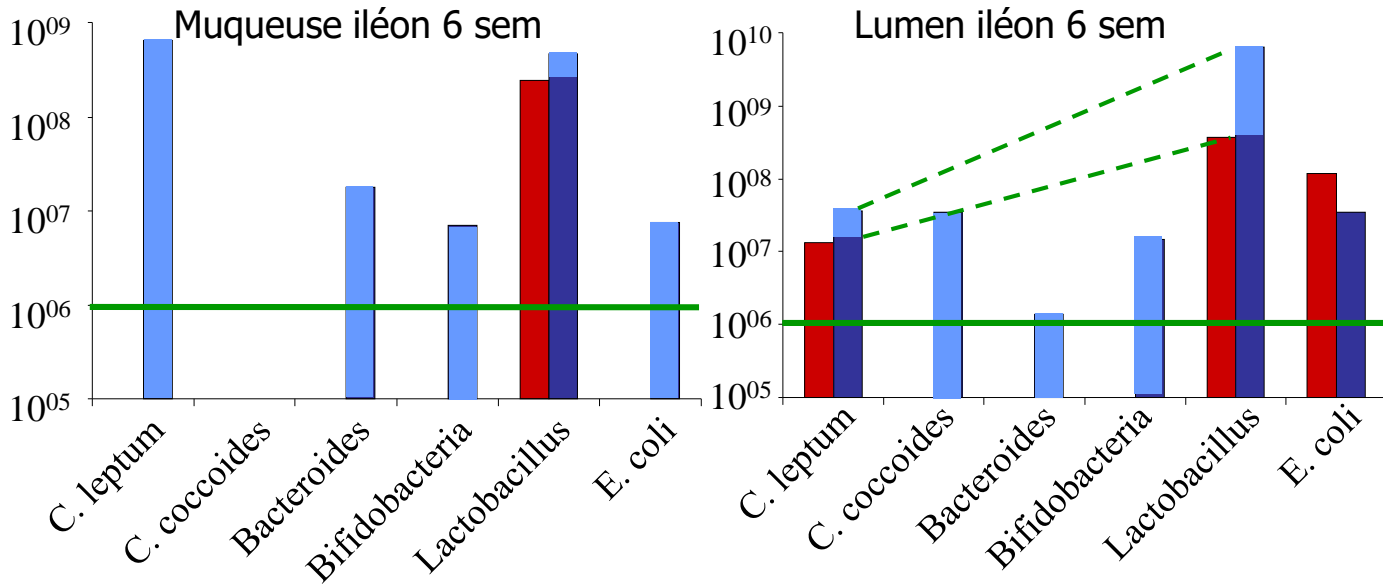
Saturation de la colonne de silice ?

- Augmentation du nombre de bactéries détectées avec la méthode **G'NOME**
- Plus le microbiote est important, plus les différences sont importantes (muqueuse iléon vs lumen caeca)

# Analyse quantitative (2)

## • Analyse de groupes

Bactéries /g



- Augmentation du nombre de bactéries détectées avec la méthode G'NOME pour la plupart des groupes

- L'amplitude des différences entre méthodes varie selon les groupes bactériens

- La majorité des groupes est sous le seuil de détection dans l'iléon avec la méthode QIAamp

# Origines de la différence d'efficacité ?

- ◆ Différence qualitative entre méthodes
- ◆ Différences quantitatives dépendant des groupes bactériens, mais méthode G'NOME globalement + efficace
  - ↳ Extraction sélective de l'ADN dépendant des espèces bactériennes
- ➡ Lyse enzymatique peu efficace sur certaines espèces ?  
Plus grande efficacité apportée par la lyse mécanique ?
- ◆ Un plus grand nombre de '*bactéries totales*' est détecté avec la méthode G'NOME, particulièrement dans les communautés bactériennes numériquement les plus importantes

➡ Saturation de la membrane de silice ?

Méthode QiaAMP avec lyse mécanique +  
baisse de la quantité d'échantillon utilisé  
→ Efficacité + proche de méthode G'NOME

La méthode **G'NOME** est la plus **adaptée** à l'analyse **quantitative** du microbiote digestif du poulet, particulièrement dans **le tractus digestif antérieur**

**Cependant**

**L'efficacité de l'extraction d'ADN dépend de l'espèce bactérienne considérée**

# UEASM

Unité d'Élevage Alternatif et  
Santé des Monogastriques

H. Juin

C. Dupont

C. Moreau-Vauzelle

P. Rideaud



# Phytosynthèse

F. Recoquillay



# UEPSD

Unité Ecologie et Physiologie du  
Système Digestif

J.P. Furet



# I.U.T. de Tours

Laboratoire de Microbiologie

J. F. Guillot



# URA

Unité de recherche avicole

I. Gabriel

M. Lessire

M. Leconte

UE PEAT



**Merci de votre attention !**

