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-03366092

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.

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

INRA

phytosynthèse
la phytothérapie animale titrée

IUT Tours

Région Centre

Unité de Recherches Avicoles
Unité d'Elevage Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours
Unité d'Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques

Approches moléculaires

Amplification PCR

ADN Bactérien

Amplicon PCR

Extraction de l'ADN bactérien

- Echantillonnage
- Lyse
- Purification de l'ADN

Séparation/détection

Echantillon biologique

Données

Analyses Qualitatives/Quantitatives

L'extraction de l'ADN bactérien peu 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 10aines d'échantillons/j)

Etapes clefs :

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

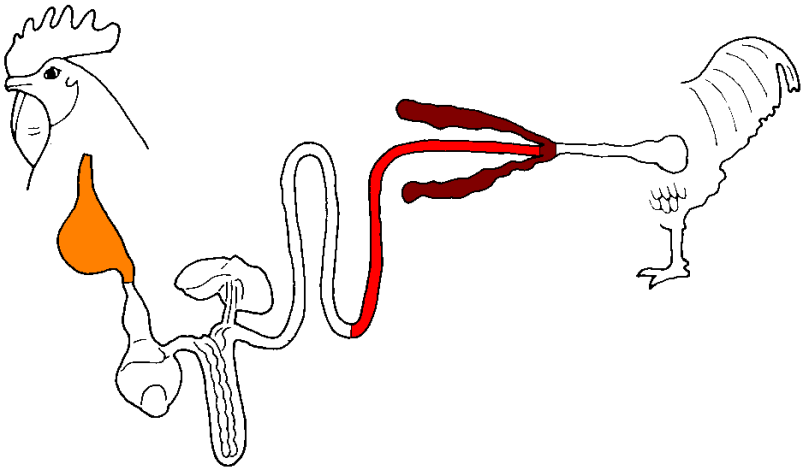
Objectif

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 laboratoire (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 1O1)

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

Méthodes d'extraction de l'ADN

Echantillon

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

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_2O et salt out mix
- Ethanol

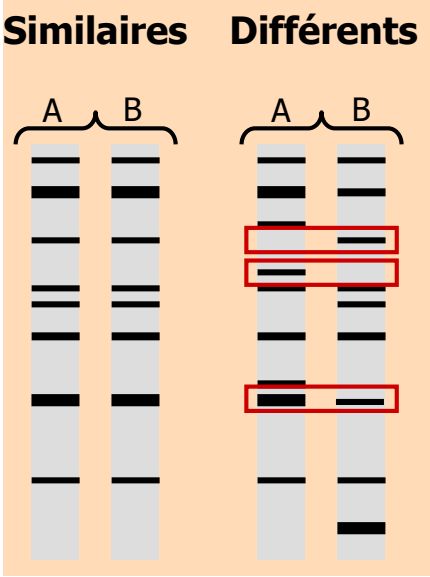
6 **Suspension de l'ADN**
- Tampon Tris-EDTA (TE)

+ long

ADN

Comparaison des 2 méthodes d'extraction

- Analyse qualitative
  - **T**emporal **T**emperature **G**radient gel **E**lectrophoresis (TTGE)
  - Amplification avec des amorces *"all bacteria"*
  - Comparaison de profiles

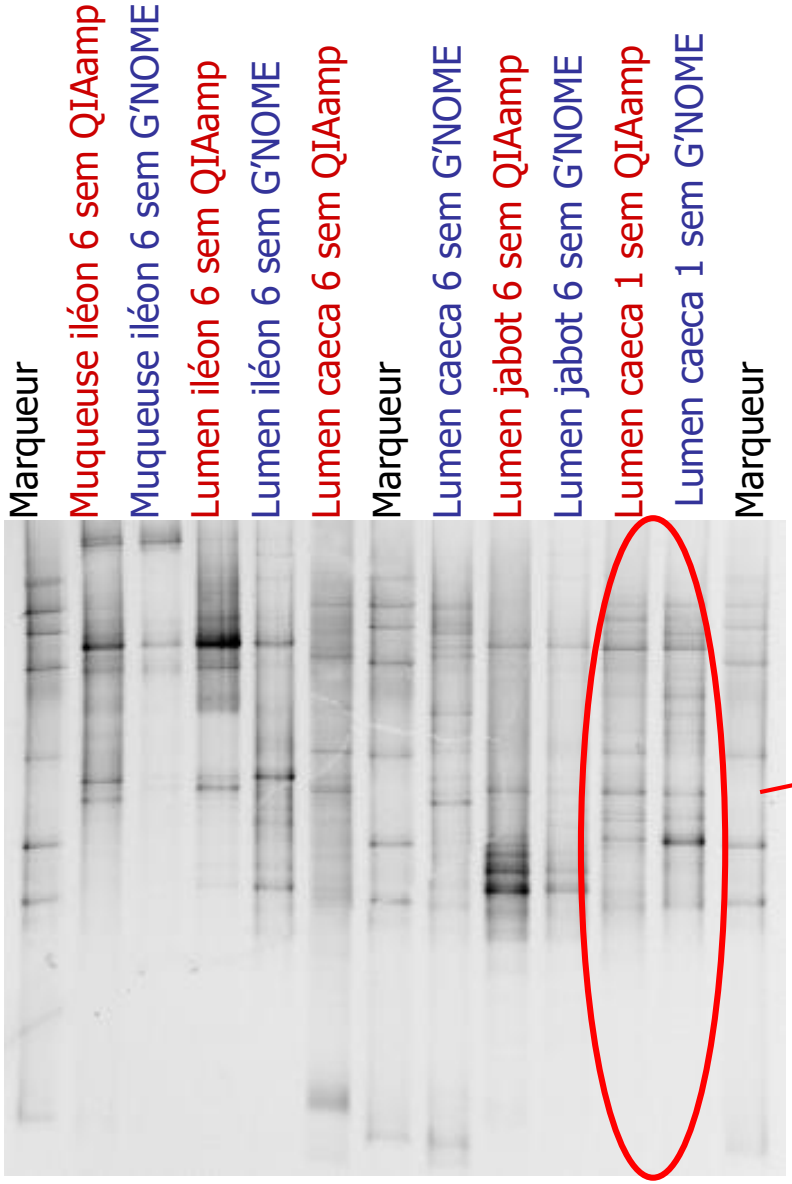


- Analyse quantitative
  - PCR en temps réel
  - Amplification avec

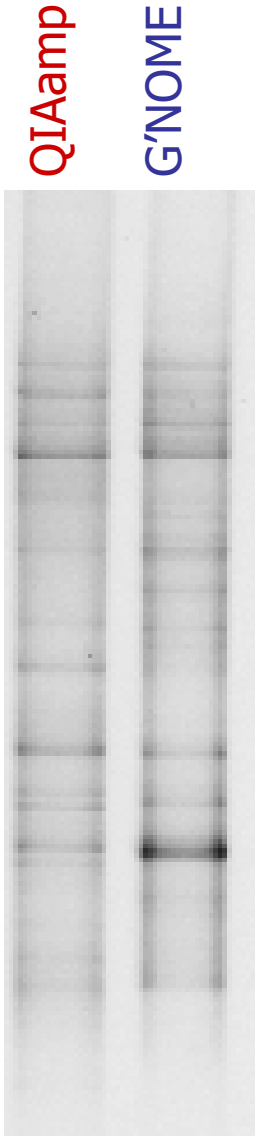
  - des amorces *"all bacteria"*

  - des amorces de groupe pour : *C. leptum, C. coccoides, Bacteroides, Bifidobacterium, Lactobacillus, et E. coli*
  - Quantification grâce à une gamme étalon (ADN génomique)

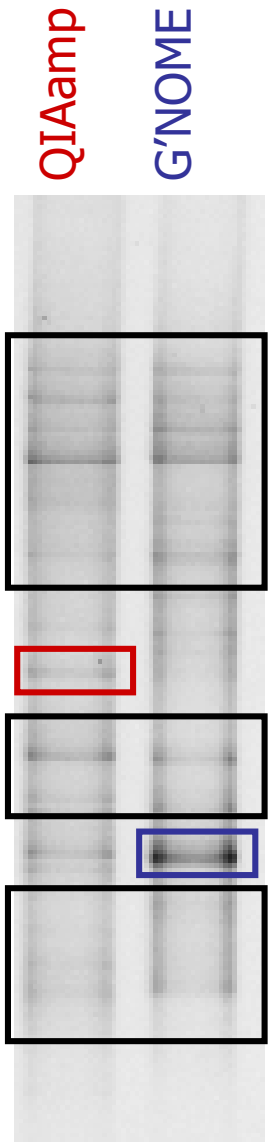
Analyse qualitative (1)



Exemple



Analyse qualitative (2)

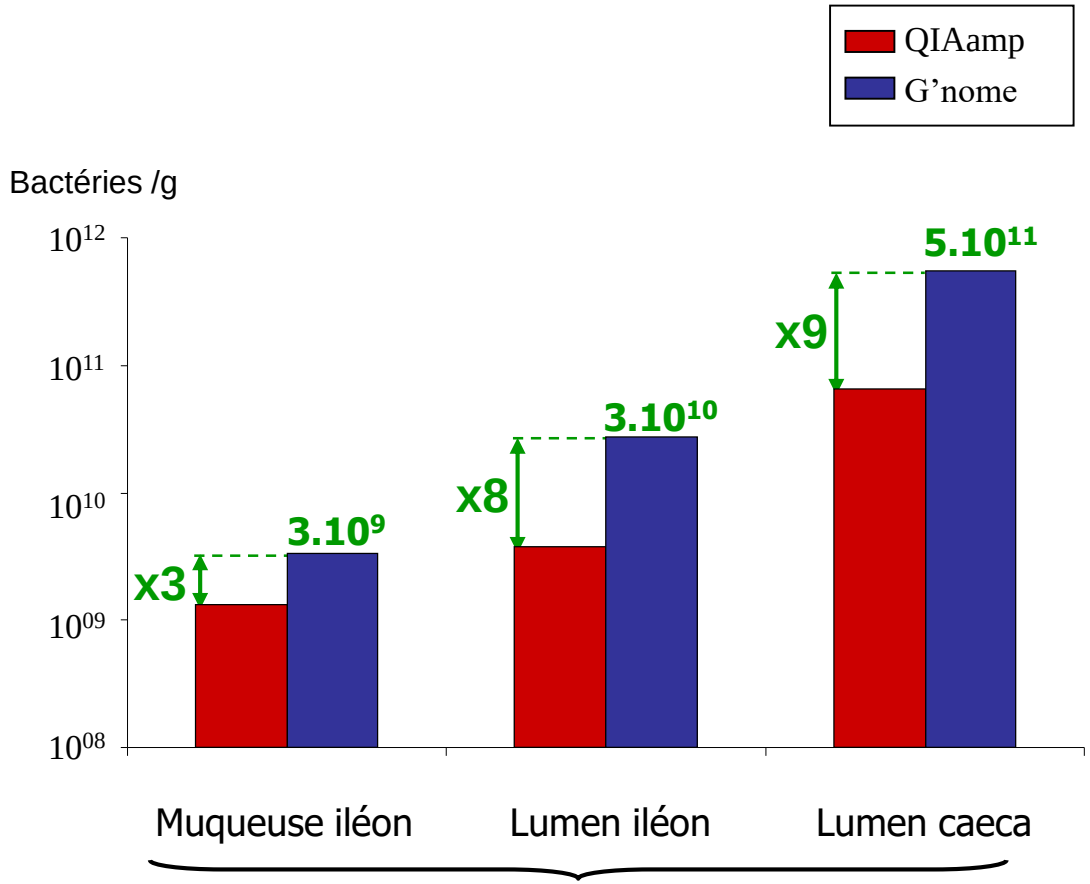


- La majorité des bandes est présente avec chaque méthode
- Certains amplicons sont moins intenses ou sont absents avec la méthode G'NOME
- Certains amplicons sont moins intenses ou sont absents avec la méthode QIAamp

➡ Sélectivité de l'extraction

Analyse quantitative (1)

- *Analyse "All bacteria"*



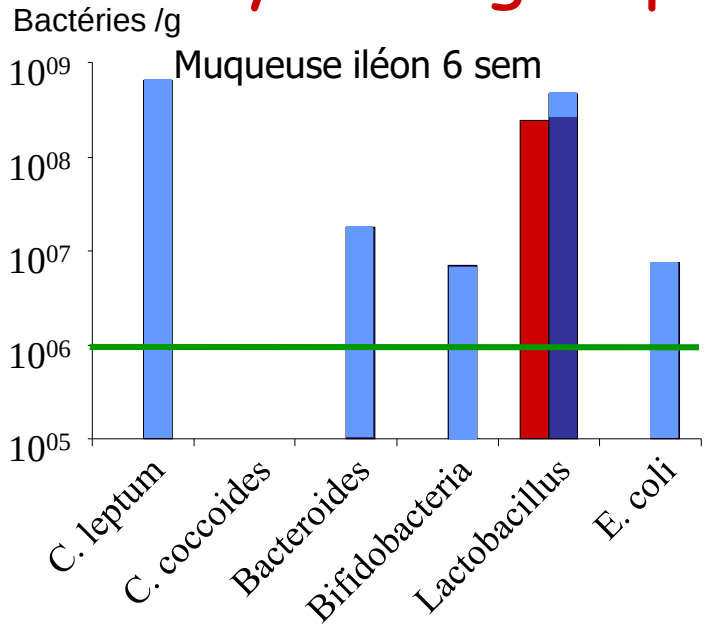
Poulets âgés de 6 semaines

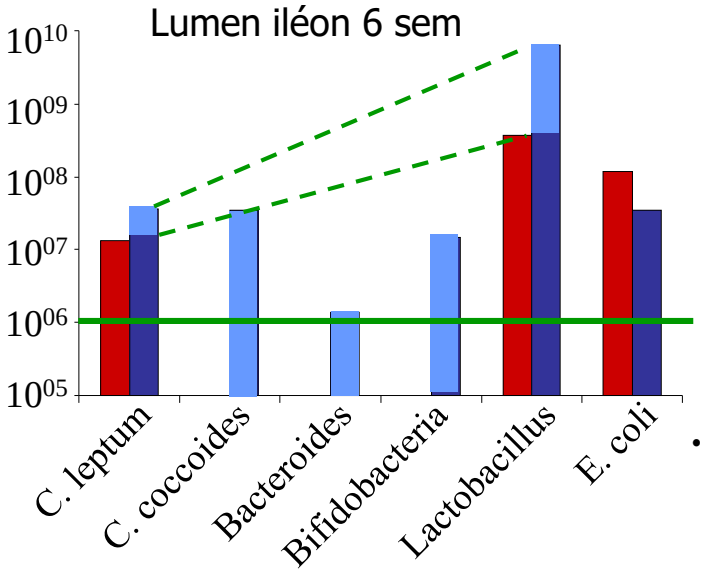
- Augmentation du nombre de bactéries détectées avec la méthode G'NOME
- Plus le microbiote est important, plus les différences sont importantes (muqueuse iléon vs lumen caeca)

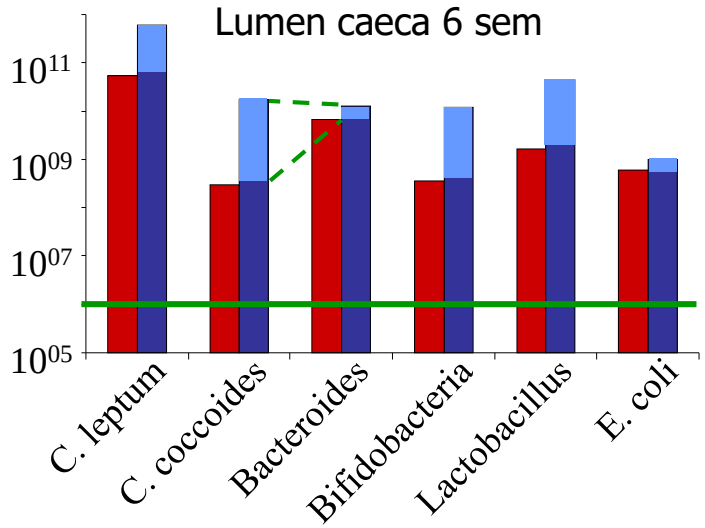
Saturation de la colonne de silice ?

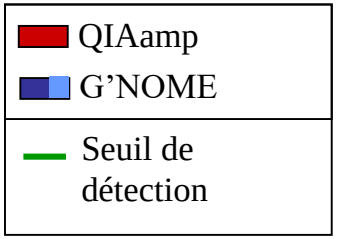
Analyse quantitative (2)

- Analyse de groupes









- 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 ?

Methode **QiaAMP** avec **lyse mécanique + baisse de la quantité d'échantillon** utilisé
⟶ **Efficacité + proche** de méthode **G'NOME**

Conclusion

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'Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques

H. Juin

C. Dupont

C. Moreau-Vauzelle

P. Rideaud

UEPSD

Unité Ecologie et Physiologie du Système Digestif

J.P. Furet

I.U.T. de Tours

Laboratoire de Microbiologie

J. F. Guillot

Phytosyntèse

F. Recoquillay

URA

Unité de recherche avicole

I. Gabriel

M. Lessire

M. Leconte

UE PEAT

Merci de votre attention !

sarah.guardia@tours.inra.fr