



HAL
open science

Mode opératoire : Composition du microbiote bactérien digestif du poulet déterminée par qPCR

Barbara Konsak, Irène Gabriel, Michel Jacques M.J. Duclos

► **To cite this version:**

Barbara Konsak, Irène Gabriel, Michel Jacques M.J. Duclos. Mode opératoire : Composition du microbiote bactérien digestif du poulet déterminée par qPCR. 2012. <hal-03794808>

HAL Id: hal-03794808

<https://hal.inrae.fr/hal-03794808v1>



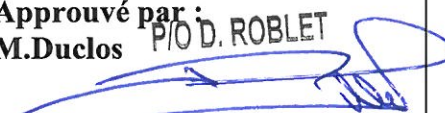
Submitted on 3 Oct 2022

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

 Institut National de la Recherche Agronomique Unité de Recherches Avicoles Unité expérimentale : PEAT	Mode opératoire	N° d'identification : 0083-MO-0173	
		Version : 01	
Composition du microbiote bactérien digestif du poulet déterminée par qPCR			
Date d'émission : 20/2/2012	Dernière mise à jour :	Date de retrait :	Nombre de pages : 19
Rédigé par : Barbara Konsak	Revu par: Irène Gabriel 	Approuvé par : M.Duclos  P/O D. ROBLET	
Diffusion : Personnels de laboratoires travaillant en écologie microbienne du tractus digestif des volailles.AQRODOC			

Mots clés : Extraction d'ADN, bactéries, contenus digestifs, muqueuses digestives, poulet

SOMMAIRE

- 1 **Objet - Domaine d'application**
- 2 **Principe**
- 3 **Réactifs**
- 4 **Appareillage**
- 5 **Mode opératoire**
- 6 **Hygiène et sécurité**
- 7 **Enregistrement et / ou expression des résultats**
- 8 **Références bibliographiques**
- 9 **Annexe**

1. **Objet - Domaine d'application**

Cette détermination du microbiote bactérien par qPCR est applicable au microbiote digestif du poulet, après extraction de l'ADN bactérien selon les méthodes indiquées (Protocoles mis en annexe). Pour l'utiliser pour d'autres microbiotes, digestifs ou non, une méthode d'extraction de l'ADN appropriée doit être utilisée, ainsi que des couples d'amorces / sonde adaptées.

2 Principe

Il s'agit de quantifier par qPCR le gène de l'ADNr16S correspondant au groupe bactérien ciblé, à partir de gammes effectuées avec de l'ADN génomique ou de l'ADNr16S de bactéries appartenant au groupe bactérien étudié. Ici sont présentés des systèmes permettant de quantifier l'ensemble des bactéries, ainsi que les groupes bactériens majoritaires du tractus digestif du poulet, à savoir : dans le phylum des Firmicutes, le genre *Lactobacillus* ainsi que les espèces *L. salivarius* et *L. crispatus*, les groupes *Clostridium coccooides* et *C. leptum* ; dans le phylum des Bacteroidetes, le genre *Bacteroides* ; dans le phylum des Proteobacteria, l'espèce *Escherichia coli*.

Dans un premier temps, la dilution optimale pour le type d'échantillon étudié doit être déterminée, pour trouver un compromis entre (1) une concentration située dans la gamme mesurable, et (2) une concentration limitant la quantité d'inhibiteurs de PCR présents dans le milieu réactionnel final.

Dans un second temps, la mesure de qPCR est réalisée. L'analyse qPCR combine la détection PCR avec les technologies de détection de fluorescence pour enregistrer l'accumulation d'amplicons en temps réel durant chaque cycle d'amplification PCR. Par détection des amplicons pendant le début de la phase exponentielle de la PCR, ceci permet de quantifier le nombre de copies de gènes dans l'échantillon de départ.

Pour l'expression des résultats, le gène de l'ADNr16S étant en nombre de copies variables selon les bactéries, même dans un groupe donné (1 à 15), elle s'effectue en nombre de copies d'ADNr16S et non pas en nombre de bactéries.

3 Réactifs et petits matériels

3.1. Réactifs

3.1.1. Produits

Alcool 70°C en pissette (à chaque endroit où c'est nécessaire)

Eau stérile (Eau PCR grade, sans nuclease, 1 litre, HyClone HyPure Molecular Biology Grade Water (Fisher Scientific, ref #9916E)) stockée à température ambiante ; aliquoter en bouteille autoclavée (ou flacon stérile) avec bouchon à vis de 50 ml (A faire sous hotte spécifique pour travaux qPCR) ; un flacon pour les dilutions de gamme et les échantillons et un autre flacon spécifique pour les dilutions des amorces / sondes et du mix

Mix PCR pour la chimie TaqMan : TaqMan Universal PCR 2 × Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France, ref 4304437) à 4°C

Mix PCR pour la chimie SybrGreen : Light Cycler 480 SYBR Green I 2 × Master Mix (Roche, Meylan, France, ref 04887352001); Stockage -20°C

3.1.2. ADN bactérien pour les gammes

3.1.2.1. ADN génomique : Pour les groupes bactériens dont la bactérie utilisée pour la gamme a sa taille de génome et son nombre de copies d'ADNr16S / génome connus

Achat de l'ADN dans des banques de données (CIRM ; 15€ ; DSMZ : 100€/25µl), ou fournit par des laboratoires d'écologie microbienne possédant des clones, fourni sous forme d'ADN génomique (Micalis, INRA Jouy : pour certains lactobacilles)

Quantité nécessaire : au moins 10 µl d'une solution à une concentration de 10⁸ copies d'ADNr16S / µl* ; permet d'effectuer 3 gammes, soit 3 plaques de 120 ech (avec dépôt en triple)

* Correspondant à 20-30 ng d'ADN génomique / µl (mais la correspondant entre concentration d'ADN en ng/µl et copies / µl dépend de la taille du génome et du nb de copies d'ADNr16S / génome)

Groupe bactérien ciblé	Espèce bactérienne utilisée	Origine de l'ADN
All bacteria	<i>E. coli</i>	ADN génomique (souche K12-1, CIRM-BP 371) provenant du CIRM-BP de Nouzilly (1)
Espèce <i>E. coli</i>		
Genre <i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	ADN génomique (souche CIRM-BIA 466) provenant du CIRM BIA de l'INRA de Rennes fournit par CIRM de Nouzilly (ref CIRM-BP 443) (1)
<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i>	ADN génomique (souche ATTC 11741 ; DSMZ 20555) provenant de MICALIS, Jouy-en-Josas) (2)
<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>	ADN génomique (ATCC 33820, DSMZ 20584) provenant de MICALIS, Jouy-en-Josas) (2)
Genre <i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	ADN- Souche (Culture anaérobie (3)) ATCC 23745 I.U.T of Tours, France

(1) CIRM : Centre International de Ressources Microbienne

(2) DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

(3) A effectuer dans un laboratoire ayant le matériel pour les cultures anaérobies

Mesure de la concentration en ng/µl par la DO260 au nanodrop (si non indiqué)

Quantifier la concentration en ng/µl de la solution de départ d'ADN à l'aide du Nanodrop par la DO 260 nm

Rappel : 1 Unité de DO correspond à 50 ng/µl pour une solution d'ADN double brin

Calcul de la concentration en nombre de copies d'ADNr16S / μ l

A partir des données de la littérature présentes dans les BD internationales

$$\text{Nb de copies d'ADNr16S par } \mu\text{l} = [(\text{Conc en ng}/\mu\text{l} \times 10^{-9}) / (\text{Taille du génome (pb)} \times \text{Pds pb})] \times \text{Nb Avogadro}) \times \text{Nb de copies d'ADNr16S par génome}$$

avec : Pds pb (poids d'une paire de base) = 660 g / mol

Nb Avogadro = $6.02214179 \times 10^{23}$

Soit

$$\text{Nb de copies d'ADNr16S par } \mu\text{l} = [(\text{Conc en ng}/\mu\text{l} \times 10^{-9}) / (\text{Taille du génome (pb)} \times 1.096 \times 10^{-21})] \times \text{Nb de copies d'ADNr16S par génome}$$

3.1.2.2. ADNr16S* : pour les groupes bactériens dont la bactérie utilisée pour la gamme n'a pas sa taille de génome et/ou son nombre de copies d'ADNr16S / génome connus :

* Inclu dans un plasmide à extraire après culture d'une bactérie vecteur (Tandem, INRA de Toulouse ; pour certaines clostridies)

En l'absence de la connaissance, à l'heure actuelle de la taille du génome et du nombre de copies d'ADNr16S / génome* pour différentes espèces bactériennes, il n'est pas possible d'utiliser de l'ADN génomique (cf 3.1.2.1.). Ceci implique d'utiliser l'ADNr16S dont la taille est connue. Concrètement cela revient à utiliser de l'ADN issus de clones bactériens obtenus lors d'inventaires moléculaires dont disposent les laboratoires effectuant des études d'écologie bactérienne sur des milieux biologiques contenant les groupes bactériens d'intérêt.

* Il n'est pas possible d'utiliser une valeur moyenne avec des bactéries du même groupe, car les valeurs sont très variables entre bactéries (Rastogi et al, 2009) ; Vérifier les nouvelles données de la littérature, ce domaine étant en évolution rapide.

Groupe bactérien ciblé	Espèce bactérienne utilisée	Origine de l'ADN
Groupes <i>C. coccoïdes</i>	<i>Clostridium coccoïdes</i>	Clone EF445150 provenant de l'UMR Tandem (Monteils et al 2008) (1)
Groupe <i>C. leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i>	Clone EF445158 provenant de l'UMR Tandem (Monteils et al 2008)
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Clone EF445171 provenant de l'UMR Tandem (Monteils et al 2008)
Genre <i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella bryantii</i>	Clone EF445235 provenant de l'UMR Tandem (Monteils et al 2008)

(1) Inventaire moléculaire du caecum de lapin à l'UMR Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme de Toulouse

Méthode d'obtention d'ADNr16S issus de clones bactériens

A partir de clones contenant les plasmides contenant l'ADNr16S de l'espèce étudiée, fourni par un laboratoire (Ex : Tandem de l'INRA de Toulouse)

Méthode 1 : Culture des clones et extraction des plasmides (A faire dans le laboratoire possédant les clones ; relativement simple)

- Culture des clones (*E. coli* ; culture aérobie dans un laboratoire de microbiologie)

- Extraction des plasmides (Ex : Qiagen Mini prep Kit)

Méthode 2 : amplification du plasmide et extraction (+ complexe, couteux en terme de produits)

Faisable à partir de l'ADN déjà présent

Multiplier le plasmide incluant le gène d'ADNr16S ciblé avec des réactifs de kit de clonage

Extraction de l'ADN des plasmides (Miniprep kit)

Mesure de concentration en ng/μl par le DO260 au nanodrop

Voir précédemment en 3.1.2.1.

Calcul de la concentration en nombre de copies / μl avec la taille du plasmide et la taille du gène d'ADNr16S ciblé, et une formule *

$[(\text{Conc g}/\mu\text{l DNA} / [\text{Taille du plasmide} + \text{Insert (pb)} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23}] \times 10^{-9} = \text{Conc nb de copies d'ADNr16S} / \mu\text{l}$

*<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>

Clones disponibles à Tandem (INRA Toulouse ; Monteils et al 2008)

Groupe ciblé	Nom du clone	Bactéries	Taille de l'ADNr16S (insert) pb	Insert+plasmide (1) (pb)
<i>C. leptum</i>	NED1G7 (EF445158.1)	(2)	1489	5445
<i>C. coccoides</i>	NED2A6 (EF445150.1)	(2)	1489	5445
<i>Bacteroides</i>	NED4B6 (EF445235)	<i>P. bryantii</i>	1490	5446
<i>Bacteroides</i>	NED4H7 (EF445224)	<i>P. ruminicola</i>	1490	5446
<i>F. prausnitzii</i>	NED1B8 (EF445171)	(2)	1474	5430
<i>F. prausnitzii</i>	NED1B8 dot (EF445171)	(2)	1474	5430

(1) Taille du vecteur PCR-4-TOPO utilisé pour les plasmides : 3956 pb

(2) Proche phylogénétiquement du groupe bactérien ciblé, reconnu par l'amorce ciblant le groupe

3.1.3. Couples d'amorces / sonde

Amorces commercialisées par Eurogentec : 40 nmol à 100 μM ; Stockage -20°C

Sondes MGB (Minor Groove Binder) commercialisées par Applied Biosystems : 6 nmol à 100 μM ; Stockage -20°C (Attention : à laisser à l'abri de la lumière car contient un fluorophore)

Attention : Compte tenu de l'évolution des travaux en écologie microbienne (séquençage massif, métagénome, reclassification), de nouvelles amorces plus adaptées peuvent être décrites dans la littérature ; Vérifier les amorces/sondes utilisées récemment par les laboratoires d'écologie microbienne.

Groupe bactérien ciblé	Séquence (5'-3')	Références
All bacteria	F : CGG TGA ATA CGT TCC CGG R : TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T P : 6FAM-CTT GTA CAC ACC GCC CGT C-MGB	Suzuki et al. (2000) modifié par Furet et al. (2009)
Genre <i>Lactobacillus</i>	F: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A R: CAC CGC TAC ACA TGG AG	F: Walter et al. (2001) R: Heilig et al. (2002)
Espèce <i>L. salivarius</i>	F: GTC GTA ACA AGG TAG CCG TAG GA R: TAA ACA AAG TAT TCG ATA AAT GTA CAG GTT P: 6-FAM-CGG CTG GAT CAC C-MGB	Harrow et al. (2007)
Espèce <i>L. crispatus</i>	F: AGC GAG CGG AAC TAA CAG ATT TAC R: AGC TGA TCA TGC GAT CTG CTT	De Backer et al. (2007)
<i>Clostridium</i> cluster XIVa and b (<i>Clostridium coccoides</i> - <i>Eubacterium rectale</i> subgroup)	F: AA TGA CGG TAC CTG ACT AA R: CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	Matsuki et al. (2002)
Groupe <i>C. leptum</i> *	F: GCA CAA GCA GTG GAG T R: CTT CCT CCG TTT TGT CAA	Matsuki et al. (2004)
Groupe de bactéries similaires aux espèces <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> et <i>Subdoligranulum variabile</i>	F: ACC ATG AGA GCC GGG GGG R: TAC CTT GTT ACG ACT T P: 6-FAM-CAC CAG TTT TAC CTT CGG-MGB (1)	Lund et al. (2010)
Espèce <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	F : CCA TGA ATT GCC TTC AAA ACT GTT R: GAG CCT CAG CGT CAG TTG TT (2)	Sokol et al (2009)
Genre <i>Bacteroides</i>	F: GAG AGG AAG GTC CCC CAC R: CGC TAC TTG GCT GGT TCA G P: 6-FAM-CCA TTG ACC AAT ATT CCT CAC TGC TGC CT-MGB	Layton et al. (2006)
Espèce <i>E. coli</i>	F: CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA R: CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA	Huijsdens et al. (2002)

P : Probe (Sonde en français) pour la sonde MGB

* Reclassement dans la famille des Ruminococaceae en mars 2010 (<http://www.uniprot.org/taxonomy/853>) (anciennement Famille des Clostridiaceae, Cluster IV des Clostridies) ; Incluant *Faecalibacterium prausnitzii*

(1) Essayer à 20µM pour les sondes et l'amorces, mais avec faible efficacité PCR et Ct trop grand : A optimiser

(2) Amorces à confirmer ; non essayées à l'URA (utilisé par R. Ducatelle, Univ Gent)

3.2. Petit matériel

- Jeu de pipettes spécifiques pour la qPCR (10µl à 1000µl) ; multipette
- 2 Portoirs de 96 trous pour tubes de 1.5 ml
- 1,5 ml microtubes (Axygen; MCT-150-C; ref #311-08-051)
- 0,5 ml tubes PCR (Axygen; PCR-05-C; ref #321-05-051)
- 2 ml Eppendorf safe lock tubes (Eppendorf ref# 0030123344)
- Cônes avec filtre pour les pipettes pour les pipetages manuels aussi bien des échantillons, des gammes d'ADN, et des mix
- Cônes avec filtre pour les pipetage par le robot- epT.I.P.S Motion Racks 1-50µl ; 10x96 Eppendorf filter tips (Eppendorf ; ref # 003014413)
- Plaque de 96 puits pour l'ADN - Thermo-Fast® 0.2ml non skirted 96well PCR plate Thermo Fisher Scientific (ref # AB-0600)
- Plaque de 384 puits - 4titude Framestar 480 384 well plates; (ref # 4ti-03-82)
- Couverture en plastique, pour fermer la plaque
- Petit sac poubelle spécifique pour le robot

- Gants

4 Appareillage

- Laboratoire dédié aux manipulations des échantillons d'ADN
- Enceinte en plexiglass (zone non contaminée) pour la préparation du mix PCR
- Nanodrop
- Robot de distribution (Epimotion 5070 , Eppendorf, Le Pecq, France) pour plaque de 384 puits (voir 96 puits)
- Thermocycleur (Light Cycler 480, Roche) pour plaque de 96 puits ou 384 puits avec logiciel Applied 7000 system software

5 Mode opératoire

5.1. Préparation des plans de plaques

Ce sont les mêmes plans de plaques qui seront utilisés pour des échantillons dosés pour différents groupes bactériens (un groupe bactérien / 1 ou plusieurs plaques selon le nombre d'échantillons (120 ech / plaque de 384 puits)) (1 plaque de 384 puits pour = 1 type de qPCR Master Mix)

Plan de plaque à 96 puits avec les échantillons dilués

Ces plaques de 96 puits seront utilisées par le robot pour le pipetage dans les plaques de 384 puits ; Doit tenir compte des possibilités de pipetage du robot liées entre autre à la différence d'espacement entre les puits des plaques de 96 puits et de 384 puits

Ex : Annexe 1

Plan de plaque à 384 puits pour le dosage qPCR

Prévoir des dépôts des échantillons et des points de gammes en triple

Rq : Aucun problème technique pour utiliser les puits des bords

Ex : Annexe 2

5.2. Préparation des solutions

5.2.1. Gamme d'ADN

A préparer sur une paillasse nettoyée à l'alcool à 70°C

Objectif : Avoir des Ct compris environ entre 15 et 30*, ce qui correspond à des concentrations de 10^6 - 10^7 copies d'ADNr16S/ μ l pour le point le plus concentré de la gamme, et donc à des concentrations de 1-10 copie/ μ l pour le point le plus faible correspondant à une dilution au $1/10^6$ du point le plus concentré

* Les valeurs de Ct les plus fiables se situent entre 20 et 25, mais il est rarement possible dans le cas de l'utilisation de la qPCR pour des estimations de populations bactériennes d'être dans cette gamme de valeurs

Pour chaque gamme, diluer l'ADN approprié par des dilutions successives de 10 en 10 en vortexant rapidement pour bien homogénéiser à chaque étape

Ex : 90 µl d'eau stérile (Eau PCR grade) + 10µl de la solution de départ

Point de gamme	Concentration en copies d'ADNr16S/µl
1	10 ⁶ -10 ⁷
2	10 ⁵ -10 ⁶
3	10 ⁴ -10 ⁵
4	10 ³ -10 ⁴
5	10 ² -10 ³
6*	10-10 ²
7*	1-10

* Pas forcément nécessaire (trop dilué, d'où des Ct trop élevés)

Faire des aliquots de 30 µl dans des tubes de 0.5 ml tubes PCR pour des utilisations ultérieures (Permet d'effectuer un pipetage avec le robot distributeur)

Rq : Conservation / Utilisation

Conservable à -20°C pendant plusieurs années (Attention aux congélations / décongélations) (Protocole d'Applied Biosystem) jusqu'à utilisation.

Sortir les dilutions de 10 en 10 de l'ADN de la gamme appropriée du congélateur et les mettre à décongeler à température ambiante (pas de température excessive : attention en été).

5.2.2. Préparation des dilutions des échantillons

A préparer sur une paillasse nettoyée à l'alcool à 70°C

Choix des dilutions

Dans le cas d'échantillons de contenus digestifs de poulets consommant des régimes riches en blé (certains glucides seraient responsables d'inhibitions de la PCR), les dilutions suivantes se sont avérées adaptées

Attention : A vérifier selon la composition des contenus digestifs, dépendant de l'alimentation et de l'animal

Segment	Localisation	Groupes bactériens ciblés		
		All Bacteria	Forte quantité * Lacto spp E.Coli	Faible quantité * C leptum C coccoides Bacteriodes
Jabot	Contenu	1/1000	1/10-1/100	1/10
Iléon	Contenu	1/1000	1/10-1/100 - 1/200	1/10
	Muqueuse	1/1 000	1/10	1/10
Caeca	Contenu	1/1000	1/50-1/1000	1/50
	Muqueuse	1/1 000	1/50	1/50

* Pour limiter le nombre de dilutions (lorsque le nombre d'échantillons est très important), il est préférable de choisir la même dilution pour tous les groupes bactériens

Dans le cas d'échantillons d'origine différente (matrice différente), il est nécessaire de rechercher la dilution optimale pour le type d'échantillon étudié, pour trouver un compromis

entre (1) une concentration située dans la gamme mesurable, et (2) une concentration limitant la quantité d'inhibiteurs de PCR présent dans le milieu réactionnel final. Pour ce faire, des dilutions de 10 en 10 des échantillons doivent être testées (voir les dilutions suivantes 1/10 ; 1/50 ; 1/100 ; 1/500 ; 1/1000 ; 1/5000), et les fortes concentrations conduisant à des valeurs inférieures aux valeurs obtenues avec de faibles concentrations, ne peuvent être retenues. On peut aussi utiliser de l'ADN exogène et le quantifier (Furet et al, 2009).

Préparation des dilutions

Préparer 200 µl* de solution diluée pour chaque échantillon dans des tubes stériles de 1.5 ml

* Utilisation de 100 µl dans la plaque 96 puits

Rq : Pour une dilution au 1/1 000, faire une pré-dilution au 1/50 (qui servira pour les groupes bactériens nécessitant une concentration plus forte), puis une dilution au 1/20

5.3. Dépôt des échantillons dans une plaque de 96 puits pour le robot distributeur

Sur une paillasse nettoyée à l'alcool 70°C

- Placer les tubes d'échantillons de 1.5 ml sur un portoir 96 trous, correspondant au plan de plaque (cf annexe 1), et avoir un second portoir de 96 trous pour mettre les échantillons déjà prélevés :

- Pour les dilutions d'échantillons : déposer 100µl* (pour servir pour plusieurs groupes bactériens)

* Le volume maximal dans les puits étant de 200 µl

- Dépôt des échantillons dilués dans la plaque de 96 puits à la main

Conservable à -20°C comme tout ADN en mettant une protection sur la plaque (couvercle spécifique ou barrette de bouchons ou film plastique autocollant)

5.4. Préparation des solutions d'amorces et de sondes

A préparer dans une zone protégée des poussières environnantes (enceinte de plexiglas avec paillasse nettoyée à l'alcool à 70°C)

Pour le calcul des volumes, prendre une marge de sécurité de 12%* pour les volumes totaux pour des plaques de 384 puits (15% pour des plaques de 96 puits)

* Facteur de sécurité habituel en biologie moléculaire

5.4.1. En chimie TaqMan

Effectuer les dilutions des réactifs (Amorces / sonde) dans des tubes de 1.5 ml

Rq : Pour limiter les congélations / décongélation des réactifs, faire des aliquots de 10 à 50µl en fonction des besoins et mettre à -20°C (on peut faire des aliquots des solutions de départ et des dilutions) ;

Rq : Faire attention à la sensibilité à la lumière de la sonde principalement pour la solution mère ; Pour le mix, qui n'est soumis à la lumière que pour une série d'échantillons, un éclairage normale de laboratoire ne pose pas de problème.

All Bacteria et *L. salivarius*

Réactif	Conc utilisée	Vol /puit	Vol total / plaque 384 puits *	Vol à préparer (+12%)
Amorce F	10 µM	0.2 µl	76.8 µl	86 µl soit 100 µl par sécurité Soit 90 µl d'eau PCR + 10 µl de solution à 100 µM
Amorce R	10 µM	0.2 µl	76.8 µl	86 µl soit 100 µl par sécurité Soit 90 µl d'eau PCR + 10 µl de solution à 100 µM
Sonde	10 µM	0.2 µl	76.8 µl	86 µl soit 100 µl par sécurité Soit 90 µl d'eau PCR + 10 µl de solution à 100 µM

* Le robot de distribution met du mix dans tous les puits même ceux sans échantillon

Bacteroides

Réactif	Conc final / puit	Vol /puit	Vol / plaque 384 puits	Vol à préparer (+12%)
Amorce F	15 µM	0.2 µl	76.8 µl	86 µl soit 100 µl par sécurité Soit 85 µl d'eau PCR + 15 µl de solution à 100µM
Amorce R	15 µM	0.2 µl	76.8 µl	86 µl soit 100 µl par sécurité Soit 85 µl d'eau PCR + 15 µl de solution à 100µM
Sonde	5 µM	0.2 µl	76.8 µl	86 µl soit 100 µl par sécurité Soit 95 µl d'eau PCR + 5 µl de solution à 100µM

5.4.2. En chimie SybrGreen

C. leptum, *C. coccoides*, *Lactobacillus*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *E.coli*

Réactif	Conc final / puit	Vol /puit	Vol / plaque 384 puits	Vol à préparer (+12%)
Amorce F	10 µM	0.5 µl	192 µl	215 µl soit 250 µl par sécurité Soit 225 µl d'eau PCR + 25 µl de solution à 100µM
Amorce R	10 µM	0.5 µl	192 µl	215 µl soit 250 µl par sécurité Soit 225 µl d'eau PCR + 25 µl de solution à 100µM

5.4.3. Stockage

Les solutions diluées d'amorces et de sondes peuvent être conservées à -20°C pendant plusieurs années

Lors de leur utilisation, vortexer et centrifuger légèrement

5.5. Préparation du mélange de qPCR

A faire juste avant de réaliser les dosages (ne pas stocker)

A préparer dans une zone protégée des poussières environnantes (enceinte de plexi avec paillasse nettoyée à l'alcool à 70°C)

Mélange de qPCR avec la chimie TaqMan pour All Bacteria, *Bacteroides* et *L. salivarius*

Avant utilisation du Master Mix (4°C), bien le vortexer (produit visqueux)

Rq : Eventuellement utiliser un cône pour un seul pipetage

Après avoir ajouté tous les réactifs, bien vortexer et centrifuger rapidement

Réactif	Vol (µl) /puit	Vol total nécessaire pour 384 puits (µl)	Vol nécessaire : Vol total + 12% (µl)	Préparation (µl) dans 2 tubes Ependorf stérile de 2 ml *
Master mix	5	1920	2150,4	1075
Amorce F (10µM)	0,2	76,8	86,016	43
Amorce R (10µM)	0,2	76,8	86,016	43
Sonde (10µM)	0,2	76,8	86,016	43
Eau qualité PCR	1,9	729,6	817,152	409
Total	7,5	2880	3225,6	1613

* Le volume maxi des tubes étant de 2 ml, préparer 2 tubes

Mélange de qPCR avec la chimie SybrGreen pour les autres groupes bactériens

Décongeler le Master mix (stocker à -20°C)

Réactif	Vol (µl) /puit	Vol total nécessaire pour 384 puits (µl)	Vol nécessaire: Vol total + 12% (µl)	Préparation (µl) dans 2 tubes de 2 ml
Master mix	5	1920	2150,4	1075
Amorce F (10µM)	0,5	192	215,04	107,5
Amorce R (10µM)	0,5	192	215,04	107,5
Eau qualité PCR	1,5	576	645,12	322,5
Total	7,5	2880	3225,6	1613

5.6. Préparation du robot distributeur (Figures 1 et 2)

Placer les tubes de Master mix, points de gamme et eau sur le portoir du robot (cf figure 2)

(1) Pour le Master mix : mettre les 2 tubes de 2 ml contenant 1613 µl (cf au dessus)

(2) Pour les points de gamme : après avoir vérifié la présence des réducteurs dans les emplacements de tubes, mettre les 7 tubes PCR de 0.5 ml contenant 30µl*

(3) Pour l'eau NTC** (Eau qualité PCR): mettre le tube PCR de 0.5 ml contenant 30µl* (avec un réducteur)

Placer la plaque de 96 puits contenant les échantillons à distribuer dans la plaque de 384 puits
* Il faut un minimum de 26µl même si il n'y aura que 2.5µl x 3 de prélever, à cause du volume mort lors du pipetage; on peut mettre plus pour différentes plaques

** No Template Control

Placer la première plaque de 96 puits contenant les échantillons, puis la seconde lorsque le logiciel le demande



Figure 1 : les 4 socles du robot distributeur (tout est réfrigéré à 4°C)

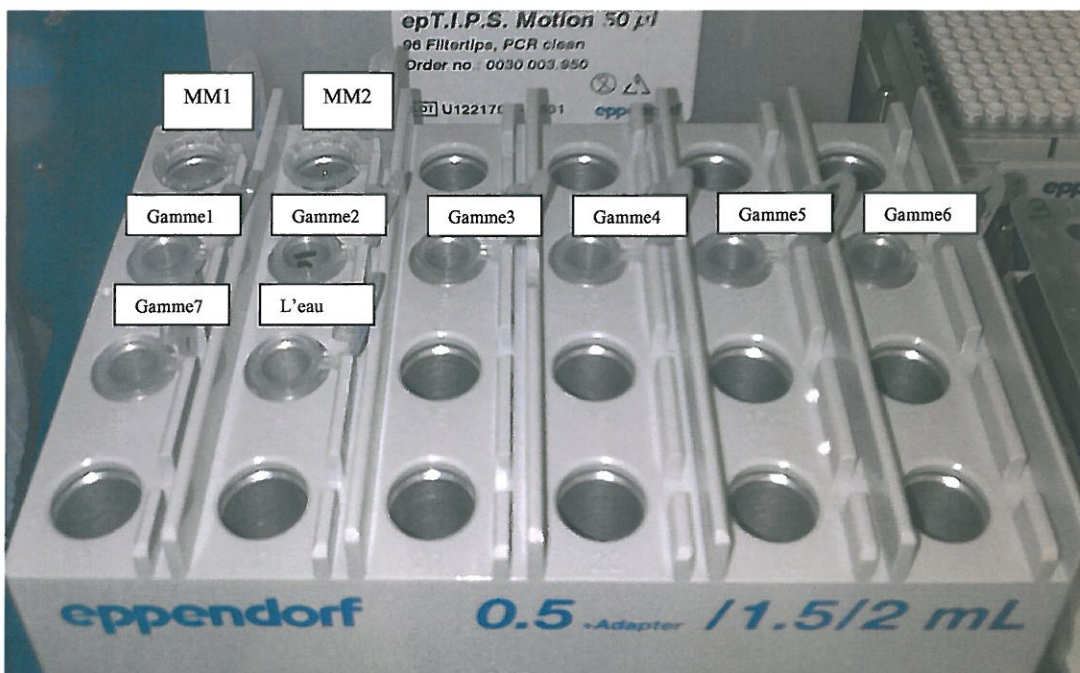


Figure 2 : Exemple de disposition des tubes de Master Mix (MM1 et MM2 : les 2 tubes), des 7 points de gamme (Gamme1 à Gamme7) et de l'eau

5.6. Distribution automatique des échantillons : Programmation du robot et réalisation

Cf document sur la programmation du robot de distribution (Epimotion 5070)

La distribution s'effectue en environ 30 min. Il faut être présent pour changer les têtes des pipettes.

Les plaques de 384 puits ainsi remplies sont conservables à 4°C la nuit protégée par du papier aluminium (Réactif TaqMan et SybrGreen sensibles à la lumière).

5.7. Réalisation de la qPCR : programmation du thermocycleur et réalisation de la qPCR

Nécessite environ 1h15min

qPCR avec la chimie TaqMan

Détection	block	volume
Mono color (FAM)	384	10µl

Taqman		
Programme name	Nb cycles	Analysis mode
Préincubation	1	None
Amplification	45*	Quantification
Cooling	1	none

* Ce nombre de cycles pourrait être réduit à 35

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold	Ramp Rate	Acquisitions
Préincubation				
95°C	none	00 :10 :00	4,8	-
Amplification				
95°C	none	00 :00 :10	4,8	-
60°C*	none	00 :00 :30	2,5	-
72°C	single	00 :00 :30	4,8	-
Cooling				
40°C	none	00 :00 :10	2	-

* Les amorces présentées ici sont fonctionnelles à une température d'amplification de 60°C

qPCR en chimie SybrGreen

Après les étapes d'amplification, une courbe de fusion est effectuée pour contrôler la spécificité du produit amplifié

Détection	block	volume
SYBR Green	384	10µl

Sybr Green Run		
Programme name	Nb cycles	Analysis mode
Préincubation	1	None
Amplification	45*	Quantification
Melting curve	1	Melting curve
Cooling	1	none

* En cas de présence d'une courbe de fusion bimodale, voir multiple, liée à la présence de plusieurs produits PCR, ce nombre de cycles peut être réduit à 40 voir 35 cycles (Bartosch et al, 2004; Rinttila et al, 2004; Chassard et al, 2010). Cette diminution du nombre de cycles permet de limiter le risque de production de produits PCR non spécifiques, et n'a pas de conséquence négative sur le dosage car les valeurs de Ct utiles sont inférieures à 35

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold	Ramp Rate	Acquisitions
Préincubation				
95°C	none	00 :10 :00	4,8	-
Amplification				
95°C	none	00 :00 :10	4,8	-
60°C *	none	00 :00 :20	2,5	-
72°C	single	00 :00 :30	4,8	-
Melting curve				
95°C	None	00 :00 :05	4,8	-
65°C	None	00 :01 :00	2,5	-
97°C	continuous	-	-	5
Cooling				
40°C	none	00 :00 :10	2	-

* Les amorces présentées ici sont fonctionnelles à une température d'amplification de 60°C

Résultats : Pour chaque échantillon, on obtient une valeur de Ct (Cycle threshold, ou cycle seuil). Il s'agit du nombre de cycles de PCR nécessaire pour avoir une fluorescence au dessus du bruit de fond. Elle est située dans l'augmentation exponentielle de la fluorescence et est corrélée directement avec le nombre de copies d'ADN matrice présent dans le milieu réactionnel. Ce nombre est déterminé par la méthode du maximum de la dérivée seconde (Tichopad et al. 2003).

5.8. Observation / Contrôle des résultats

5.8.1. Chimie SybrGreen

Contrôler la présence d'un seul pic en courbe de fusion (35 à 45 cycles) pour s'assurer de la spécificité du produit amplifié (Smith et Osborn, 2009). La courbe de fusion ne doit présenter

qu'un seul pic pouvant présenter un léger décalage (1 ou 2°C) par rapport à la température de fusion observée dans le cas de la gamme, et un élargissement (modéré).

En cas de décalage plus important entre la température de fusion de l'échantillon et de la gamme, ou de la présence de 2 pics ou plus, d'autres conditions de PCR doivent être recherchées (augmentation de la température d'hybridation ; autres couples d'amorces)

Contrôler la taille de l'amplicon sur gel d'agarose (Smith et Osborn, 2009 ; voir protocole spécifique)

5.8.2. Courbe d'amplification

La courbe d'amplification doit avoir une forme sigmoïde, sinon les échantillons sont considérés comme non déterminés.

5.8.3. Observation des valeurs de Ct

Pour la gamme, vérifier l'efficacité de la PCR

Les échantillons dont les valeurs de Ct sont les suivantes sont considérés comme non déterminés :

- Valeurs hors de la gamme 1 à 7
- Valeurs inférieures à $Ct_{Eau, NTC} - 3.3$ (Smith et Osborn, 2009), voir $Ct_{Eau, NTC} - 2$.
- Trop forte variabilité entre les 3 valeurs (+3% ou 0.5 de déviation standard)

Rq : Les valeurs de Ct entre 20 et 25 sont préférables

6 Hygiène et sécurité

Le SYBR Green présente une mutagenicité non nulle mais cependant très inférieure au Bromure d'éthidium. Les précautions d'usage doivent être néanmoins conservées.

Utiliser une blouse et des gants pour protéger les échantillons.

7 Enregistrement et / ou expression des résultats : Calcul de la concentration en copies d'ADNr 16S par quantité d'échantillon extrait

Les résultats donnés par le logiciel d'analyse de l'appareil qPCR, correspondent au nombre de copies d'ADNr 16S dans les 2.5µl utilisé pour le dosage

Il faut donc tenir compte de :

- Dilution de l'extrait d'ADN avant la PCR
- Etapes d'extraction de l'ADN
 - Volume de reprise de l'ADN en fin d'extraction de l'ADN
 - le volume d'extrait ADN purifié par rapport au volume d'extrait total brut obtenu
- la Q d'ech extrait pour ramener à 1 g d'échantillon

Ou pour les muqueuses : d'exprimer les résultats par segment total

Ex : Pour les contenus digestifs extraits avec la méthode de QIAamp DNA mini kit

Nb copies d'ADNr16S / g de contenus digestif =

[ConcEchDosé (Nb copies/ μ l) x Dilution x Vol reprise (μ l) x (Vol extrait / Vol utilisé)] / Poids ech (g)

Avec - Dilution de 20 à 1 000

- Vol reprise : 200 μ l

- Vol extrait / Vol utilisé : 1300 μ l / 800 μ l

- Poids d'éch : 0.025 à 0.050 g

8 Références bibliographiques

- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T., McMurdo, M.E.T. (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3575-3581.
- Chassard, C. Delmas, E., Robert, C., Bernalier-Donadille, A. (2010). "The cellulose-degrading microbial community of the human gut varies according to the presence or absence of methanogens." *FEMS Microbiol Ecol.* 74(1): 205-213.
- De Backer, E., Verhelst, R., Verstraelen, H., Alqumber, M.A., Burton, J.P., Tagg, J.R., Temmerman, M., Vanechoutte, M. (2007). "Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*." *BMC Microbiology* 7.
- Furet, J. P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., Corthier, G. (2009). "Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR." *FEMS Microbiol Ecol.* 68 (3): 351-362.
- Heilig, H. G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D., de Vos, W.M. (2002). "Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA." *Appl Environ Microbiol* 68(1): 114-23.
- Harrow, S. A., Ravindran, V., Butler, R. C., Marshall, J. W., Tannock, G. W. (2007). "Real-time quantitative PCR measurement of ileal *Lactobacillus salivarius* populations from broiler chickens to determine the influence of farming practices." *Applied and Environmental Microbiology* 73(22): 7123-7127.
- Huijsdens, X. W., Linskens, R. K., Mak, M., Meuwissen, S. G., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Savelkoul, P. H. (2002). "Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR." *J Clin Microbiol* 40(12): 4423-7.
- Kubista, Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Molec Aspects Med* 27: 95-125.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., Sayler, G. (2006). "Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water." *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 4214-4224.
- Lund, M., Bjerrum, L., Pedersen, K. (2010). "Quantification of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens by real-time PCR." *Poult Sci.* 2010 Jun;89(6):1217-24.
- Luu-The, V., Paquet, N., Calvo, E., Cumps, J. (2005). "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction." *Biotechniques* 38(2): 287-293.

- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., Tanaka, R. (2002). "Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces." *Applied Environmental Microbiology* 68: 5445-5451.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., Tanaka, R. (2004). "Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces." *Applied Environmental Microbiology* 70: 7220-7228.
- Monteils, V. and C. S. Cauquil L, Godon JJ, Gidenne T. (2008). "Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum." *FEMS Microbiol Ecol.* 2008 Dec;66(3):620-9.
- Rastogi, R., Wu, M., DasGupta, I., Fox, G. E. (2009). "Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution." *BMC Microbiology* 9(1): 208.
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A. (2004). "Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR." *Journal of Applied Microbiology* 97: 1166-1177.
- Smith, C. J., Osborn, A. M. (2009). "Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology." *FEMS Microbiol Ecol.* 2009 Jan;67(1):6-20. Review.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J. P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, L., Beaugerie, L., Cosnes, J. Corthier, G., Marteau, P., Dore, J. (2009). "Low Counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in Colitis Microbiota." *Inflammatory Bowel Diseases* 15(8): 1183-1189.
- Suzuki, M. T., Taylor, L.T., DeLong, E.F. (2000). "Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays." *Appl Environ Microbiol.* 2000 Nov;66(11):4605-14.
- Rutledge, R. G. (2004). "Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications." *Nucleic Acids Research* 32(22).
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M. W. (2003). "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up." *Nucleic Acids Research* 31(22): 6688-6688.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P. (2001). "Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* and *Leuconostoc* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis." *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2578-2585.

Protocoles associés

Protocole d'extraction d'ADN bactérien dans des contenus digestifs et des extraits de muqueuses digestives de poulets selon une méthode modifiée à partir du kit DNAeasy Blood and Tissue de Qiagen N° 0083-MO-0172

Protocole d'extraction d'ADN bactérien dans des contenus digestifs et des extraits de muqueuses digestives de poulets selon une méthode modifiée à partir du kit G'Nome de Bio101 (Furet et al, 2009)

9 Annexe

Annexe 1 : Plan de plaque à 96 puits avec les échantillons dilués pour le pipetage par le robot (ex : 120 ech)

Plaque 1

Correspondance Plaque 384 puits puits 1-3		Correspondance Plaque 384 puits puits 4-6		Correspondance Plaque 384 puits puits 7-9		Correspondance Plaque 384 puits puits 10-12		Correspondance Plaque 384 puits puits 13-15		Correspondance Plaque 384 puits puits 16-18	
1	2	17	18	33	34	49	50	65	66	81	82
3	4	19	20	35	36	51	52	67	68	83	84
5	6	21	22	37	38	53	54	69	70	85	86
7	8	23	24	39	40	55	56	71	72	87	88
9	10	25	26	41	42	57	58	73	74	89	90
11	12	27	28	43	44	59	60	75	76	91	92
13	14	29	30	45	46	61	62	77	78	93	94
15	16	31	32	46	48	63	64	79	80	95	96

Plaque 2

Correspondance Plaque 384 puits puits 19-21		Correspondance Plaque 384 puits puits 22-24	
97	98	113	114
99	100	115	116
101	102	117	118
103	104	119	120
105	106		
107	108		
109	110		
111	112		

Composition du microbiote bactérien digestif du poulet
déterminée par qPCR

Annexe 2 : Plan de plaque à 384 puits pour le dosage qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	1	1	1	17	17	17	33	33	33	49	49	49	65	65	65	81	81	81	97	97	97	113	113	113	113
B	2	2	2	18	18	18	34	34	34	50	50	50	66	66	66	82	82	82	98	98	98	114	114	114	114
C	3	3	3	19	19	19	35	35	35	51	51	51	67	67	67	83	83	83	99	99	99	115	115	115	115
D	4	4	4	20	20	20	36	36	36	52	52	52	68	68	68	84	84	84	100	100	100	116	116	116	116
E	5	5	5	21	21	21	37	37	37	53	53	53	69	69	69	85	85	85	101	101	101	117	117	117	117
F	6	6	6	22	22	22	38	38	38	54	54	54	70	70	70	86	86	86	102	102	102	118	118	118	118
G	7	7	7	23	23	23	39	39	39	55	55	55	71	71	71	87	87	87	103	103	103	119	119	119	119
H	8	8	8	24	24	24	40	40	40	56	56	56	72	72	72	88	88	88	104	104	104	120	120	120	120
I	9	9	9	25	25	25	41	41	41	57	57	57	73	73	73	89	89	89	105	105	105	Gamme1	Gamme1	Gamme1	Gamme1
J	10	10	10	26	26	26	42	42	42	58	58	58	74	74	74	90	90	90	106	106	106	Gamme2	Gamme2	Gamme2	Gamme2
K	11	11	11	27	27	27	43	43	43	59	59	59	75	75	75	91	91	91	107	107	107	Gamme3	Gamme3	Gamme3	Gamme3
L	12	12	12	28	28	28	44	44	44	60	60	60	76	76	76	92	92	92	108	108	108	Gamme4	Gamme4	Gamme4	Gamme4
M	13	13	13	29	29	29	45	45	45	61	61	61	77	77	77	93	93	93	109	109	109	Gamme5	Gamme5	Gamme5	Gamme5
N	14	14	14	30	30	30	46	46	46	62	62	62	78	78	78	94	94	94	110	110	110	Gamme6	Gamme6	Gamme6	Gamme6
O	15	15	15	31	31	31	47	47	47	63	63	63	79	79	79	95	95	95	111	111	111	Gamme7	Gamme7	Gamme7	Gamme7
P	16	16	16	32	32	32	48	48	48	64	64	64	80	80	80	96	96	96	112	112	112	NTC	NTC	NTC	NTC