

qPCR

LA PCR QUANTITATIVE (QPCR) POUR LA MESURE DE L'ABONDANCE DE GENES MICROBIENS

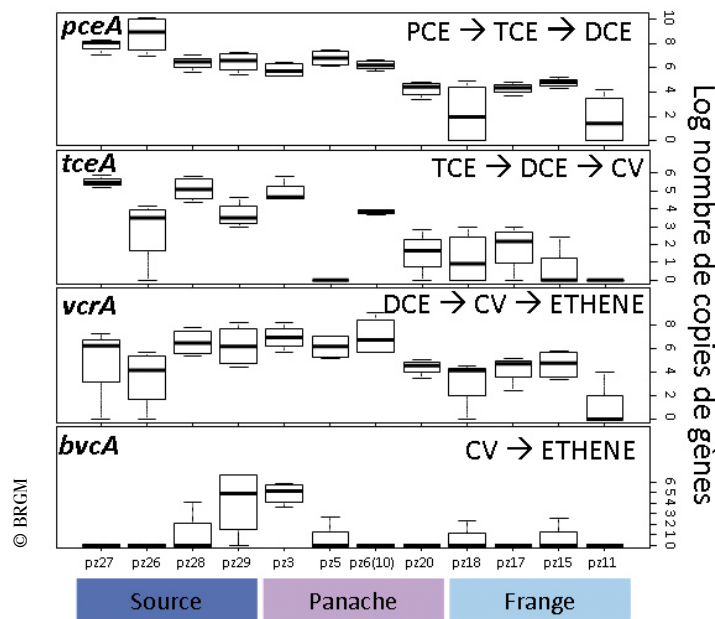
DESCRIPTION THÉORIQUE DU PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

La qPCR (réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel) est une technique de biologie moléculaire qui mesure l'abondance de gènes. La mesure de l'abondance de gènes microbiens en copies de gènes par mL ou en copies de gènes par gramme de quantifier la biomasse microbienne (bactérienne, archéenne ou fongique) présente. Elle peut également quantifier un potentiel génétique du milieu à dégrader ou à transformer un polluant ou à réaliser une activité métabolique (cycles biogéochimiques).

La qPCR peut baser la mesure de l'abondance d'un gène sur sa présence (ADN) ou sur son expression (ARN). L'amplification par PCR consiste à dupliquer de manière exponentielle et

maîtrisée un fragment d'ADN connu à partir d'une faible quantité contenue dans un échantillon. La quantification des fragments d'ADN obtenus permet de renseigner l'abondance du gène dans le milieu étudié. Dans le cas où l'ARN est ciblé, un ADN complémentaire (ADNc) est d'abord généré avant la mesure. Quoi qu'il en soit, cette approche nécessite de connaître le gène ciblé afin de l'amplifier spécifiquement, on parle d'approche ciblée.

À l'inverse du séquençage, la qPCR quantifie l'abondance d'un gène sans identifier les microorganismes qui le portent.



Exemple de quantification de l'abondance de gènes codant des déhalogénases d'éthènes chlorés dans une eau souterraine polluée - Source [3].

CONTEXTE D'UTILISATION

La qPCR peut s'appliquer sur la plupart des sites et sur l'ensemble des milieux (sol, eau, air, déchets). Elle complète les outils physico-chimiques classiques et permet d'approfondir la connaissance du milieu et des réactions microbiologiques potentielles (ADN) ou qui s'y déroulent (ARN).

À quelle étape ?

Lors de l'évaluation de l'état écologique d'un site au cours du diagnostic, la qPCR permet de déterminer l'état microbiologique de cet environnement à travers l'analyse de groupes ou de taxons microbiens connus, de gènes fonctionnels ou de leur expression.

Lors de la phase d'évaluation d'une possible mise en place de biotraitement, la qPCR permet d'évaluer la présence d'un potentiel de dégradation ou de transformation spécifique des polluants concernés ainsi que son expression *in situ*.

Enfin, lors du suivi du biotraitement ou de la surveillance environnementale, la qPCR permet un suivi de la dynamique des populations microbiennes (présence, augmentation, maintien de l'abondance microbienne) ou du maintien de l'activité des gènes de dégradation.

Cette technique peut également être combinée avec d'autres techniques moléculaires lors de toutes les phases de gestion des sites et sols pollués dans le but d'affiner la compréhension du milieu et le rôle et l'impact de la microflore de ce milieu.

POLLUANTS CONCERNÉS

La mesure de l'abondance de gènes microbiens par qPCR est applicable indépendamment du polluant lorsque c'est l'état microbiologique du milieu (biomasse microbienne, état fonctionnel, capacité de résistance et de résilience de la biomasse microbienne ou de la communauté entière) sous influence du polluant qui est analysé.

Cette mesure est pertinente dans un contexte de pollution par des substances organiques biodégradables tels que les BTEX, les COHV ou de nombreux autres polluants. Elle est également pertinente en présence d'As, Cr et Hg pour lesquels une réaction bactérienne d'oxydo-réduction influence la mobilité et la spéciation.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE

Le matériel nécessaire au prélèvement des micro-organismes correspond à celui des prélèvements physico-chimiques, à la différence que les contenants doivent être stériles. Pour une eau, selon la quantité de biomasse, prévoir des volumes de un à plusieurs litres qui seront filtrés stérilement. Pour un sol, l'extraction des ADN et ARN totaux (messagers et ribosomiques) se fait sur des faibles quantités (1 à 10 g). Il est possible de stocker les filtres ou les sols à -20°C ou -80°C avant l'extraction des ADN microbiens. Pour la récupération des ARN, une cryo-fixation (azote liquide, congélation -20°C ou -80°C) dès le prélèvement est recommandé pour

la bonne conservation des ARN messagers qui se dégradent rapidement.

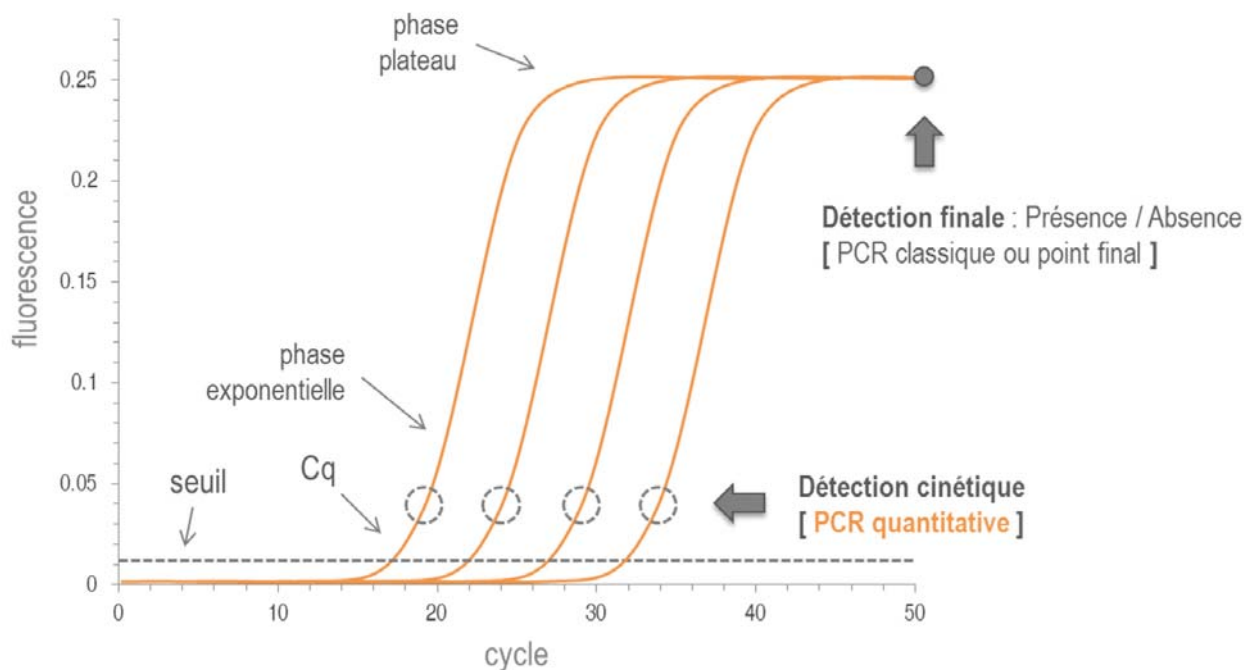
D'autres approches se développent avec des cultures ou échantillonnages *in situ* de communautés microbiennes sur des supports spécifiques (échantillonneurs passifs) qui peuvent nécessiter plusieurs déplacements (installation et récupération un mois plus tard).

Du matériel de laboratoire courant est requis (pipettes, centrifugeuses, hottes, électrophorèse) ainsi que du matériel spécifique à la technique (thermocycleur).

MÉTHODOLOGIE

L'étape de prélèvement des échantillons de sol ou d'eau ne diffère pas des prélèvements physico-chimiques. Une fois l'échantillon réceptionné au laboratoire, l'ADN ou l'ARN total est extrait de l'échantillon et purifié. Les phases de prélèvement et conservation de l'échantillon et d'extraction de l'ADN ou de l'ARN sont des phases critiques dont la qualité influe directement sur les résultats.

La qPCR consiste à amplifier un fragment d'ADN, ou ADN complémentaire (ADNc) pour l'ARN, en le dupliquant de manière exponentielle et maîtrisée. La détection des fragments amplifiés se fait par fluorescence en début de réaction lorsque le signal est proportionnel à la quantité initiale du fragment cible. Le nombre de copies de l'ADN cible est ensuite mesuré à l'aide d'une courbe étalon.



Principe de la qPCR - Source [2].

AVANTAGES – INCONVÉNIENTS – MATURITÉ DE LA TECHNIQUE

AVANTAGES

Echantillonnage

- Réalisé sur toutes les matrices naturelles et déchets,

Polluant

- Technique disponible pour un grand nombre de groupes ou taxons microbiens connus et de gènes fonctionnels de biodégradation ou de biotransformation,

Laboratoires, matériel d'analyse

- Facile à mettre en œuvre

Résultats d'analyse

- Robuste,
- Standardisation possible,
- Quantitatif.

INCONVÉNIENTS

Polluant

- Besoin de connaître les voies métaboliques et les gènes cibles,

Laboratoires, matériel d'analyse

- Nécessité de personnel expérimenté,
- Effet de laboratoire mis en évidence sur la reproductibilité,

Résultats d'analyse

- L'interprétation doit prendre en compte le type de polluant, les voies de biodégradation et les paramètres géochimiques du site au moment de l'analyse,
- Matériel spécifique,
- Pas de référentiel,
- Existence d'inhibiteurs dans certains échantillons.

MATURITÉ DE LA TECHNIQUE



R&D aboutie, indicateurs développés ou en cours de développement, technique encore peu utilisée sur le terrain à l'heure actuelle

DÉLAIS DE MISE EN ŒUVRE

La phase d'échantillonnage sur site est rapide et identique à un prélèvement pour analyse chimique. Les phases d'analyse

et d'interprétation des résultats sont de l'ordre de 2-3 jours.

PHASE

PRÉLÈVEMENT

ANALYSE

TRAITEMENT

Délai associé



⌚: jour / ⌚⌚: semaine / ⌚⌚⌚: mois

ÉLÉMENTS DE COÛTS

De même que pour les délais, les coûts de l'échantillonnage sont comparables aux coûts des prélèvements pour analyses chimiques ; ils correspondent au coût de l'opérateur sur site. Le coût d'une analyse en laboratoire est d'une centaine d'euros

par échantillon, coût comprenant la préparation, l'analyse, la vérification de la qualité et le rapport analytique. A ces coûts s'ajoutent le prix de traitement des résultats obtenus par un expert.

PHASE

PRÉLÈVEMENT

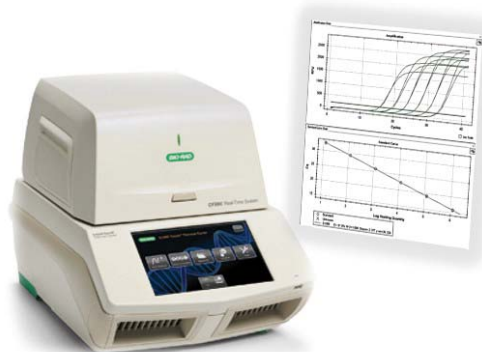
ANALYSE

TRAITEMENT

Coût associé



€ < 100 € / €€ < 1000 € / €€€ > 1000 €



Systeme de PCR en temps réel BioRad.

POUR EN SAVOIR PLUS - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] *La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental. Expertises Ademe, octobre 2017 - Fiche technique 2*

[2] *Etude Ademe, Janvier 2015 : Les outils de biologie moléculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués, J.M. Monier, S. Cécillon - Fiche F1*

[3] *Fiche bioindicateur 1 - Potentiel génétique de déchloration réductrice des éthènes chlorés évalué par la mesure de l'abondance de gènes fonctionnels spécifiques Jennifer Hellal et Catherine Joulian - BRGM*

[4] *Norme NF EN ISO 11063 Qualité du sol - Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol*

[5] *Norme NF EN ISO 17601 Qualité du sol - Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative à partir d'ADN directement extrait du sol*