# OPTIMISATION D'UN PROTOCOLE POUR LA DETECTION D'ADN BACTERIEN DANS L'AIR

M.Gaboriau[1] et F.Cohen*[2]
[1]Bertin Technologies, 78180 Montigny-le-Bretonneux, France
[2]Bertin Corp, 20850 Rockville, United States
*Courriel de l'orateur : floriane.cohen@bertin.group

## OPTIMIZATION OF A PROTOCOL FOR THE DETECTION OF BACTERIAL DNA IN THE AIR

## ABSTRACT

The composition and concentration of bioaerosols is a critical parameter to consider for the welfare of animals and humans. Monitoring bioaerosols by air sampling is one of the most efficient methods available. Nonetheless, the detection of DNA from bioaerosols can be challenging without the appropriate tools and the optimization of the sampling and detection protocols. Furthermore, there are many additional factors that need to be considered during the workflow in order to obtain the best results. In this study, we present an optimized protocol to detect bacterial DNA in the air with the Coriolis µ air sampler (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). This protocol can help users to verify the effectiveness of their air sampling protocol by confirming that the collection of bacterial DNA from the air was successful. We also show some examples of results in a case study on samples collected indoors and outdoors.

## RESUME

La composition et la concentration des bioaérosols est un paramètre critique à considérer pour la santé des animaux et des êtres humains. Monitorer les bioaérosols en échantillonnant l'air est une des méthodes les plus efficaces pour les étudier. Cependant, la détection d'ADN dans des bioaérosols peut présenter de nombreuses difficultés sans les outils appropriés et l'optimisation des protocoles d'échantillonnage et de détection. De plus, il y a de nombreux facteurs supplémentaires à prendre en compte pour le protocole afin d'assurer des résultats satisfaisants. Dans cette étude, nous présentons un protocole optimisé pour la détection d'ADN bactérien dans l'air avec l'échantillonneur d'air Coriolis µ (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Ce protocole permet aux utilisateurs de vérifier l'efficacité de leur protocole d'échantillonnage d'air en confirmant qu'ils ont bien réussi à collecter de l'ADN bactérien. Nous montrons ensuite quelques exemples de résultats obtenus avec ce protocole, en extérieur et en intérieur.

**KEYWORDS:** bioaerosols, air sampling, bacteria, public health / **MOTS-CLES :** bioaérosols, échantillonnage d'air, bactéries, santé publique

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Protocole d'échantillonnage d'air

Le Coriolis µ a été placé à environ 1,2m au-dessus du sol. Pour les échantillons collectés en extérieur, les prélèvements ont été réalisés dans le parc de Bertin Technologies (France). Les échantillons collectés en intérieur ont été prélevés dans la cafétéria de Bertin Technologies.
Au total, cinq échantillons ont été prélevés avec le Coriolis µ, en utilisant le liquide de collecte suivant : 15 ml d'eau déionisée + 0,005% Triton. 3 échantillons ont été collectés en extérieur, et 2 en intérieur.
Afin de déterminer l'effet de la durée de l'échantillonnage, deux durées de collecte ont été testées : 10min et 20min. Pour tous les prélèvements, le débit d'air choisi était de 300L/min.

### 1.2. Stockage des échantillons

Tous les échantillons ont été conservés à -20°C après la collecte.

### 1.3. Concentration des échantillons

Dans le but de tester l'effet de la filtration sur les échantillons, deux méthodes ont été utilisées pour concentrer les échantillons prélevés en extérieur : la centrifugation et la filtration.

Dans le cas de la méthode de centrifugation, deux échantillons (obtenus respectivement après 10min et 20min de collecte) ont été centrifugés à une vitesse maximale (16000 rpm) pendant 10min. Le surnageant a été enlevé afin d'obtenir un échantillon concentré de 400 µL.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2023-32911 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

Dans le cas de la filtration, l'échantillon restant (résultant d'une de collecte de 10min) a été passé à travers un filtre Amicon Ultra 15 100 KDa. Puis une étape de centrifugation de 3 minutes à vitesse maximale (16000rpm) a permis d'obtenir un échantillon concentré de 400 µL.

### 1.4. Extraction d'ADN

L'ADN bactérien a été extrait avec le kit GenElute Bacterial Genomic DNA kit de Sigma. La concentration d'ADN a ensuite été quantifiée à l'aide d'un Nanodrop (Tableau 1).

### 1.5. qPCR pour l'ARNr 16S bactérien

Afin de quantifier le gène codant pour l'ARNr 16S dans les bioaérosols collectés avec le Coriolis en intérieur et en extérieur, un test qPCR basé sur le SYBR-Green a été réalisé sur un instrument Q qPCR de Quantabio (Quantabio, Beverly, MA). Le jeu de primers universels ciblant le gène de l'ARNr 16S bactérien contenait le primer forward suivant : 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' et le primer reverse suivant: 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT- avec une taille d'amplicon de 466bp sur la référence du génome de E.coli.
Les PCR ont été réalisées dans un volume total de 25µL contenant 12,5 µl de 2X PerfeCTa SYBR Green FastMix(QuantaBio, Beverly, MA), 1 µl de chaque primer 500 nM, 10 µl d'ADN template et 0,5 µl d'eau de qualité biologie moléculaire. Le thermocycleur a été programmé pour effectuer 10 minutes de dénaturation à 95°C, 40 cycles de 15s de dénaturation à 95°C et une étape d'annealing/extension à 60°C, avec une étape supplémentaire d'extension de 30s à 72°C. Après l'achèvement de l'amplification PCR, une analyse "melt-curve" a été effectuée pour contrôler la pureté des amplicons générés. Une dilution en série 10-fold d'ADN bactérien a été amplifiée afin d'obtenir une courbe standard sur la plaque de réaction.
Les produits qPCR ont aussi été imagés grâce à un gel d'agarose 1% E-gel avec SYBR Safe (Invitrogen).

## 2. RESULTATS

L'ADN bactérien présent dans les échantillons prélevés en extérieur et en intérieur a été analysé par qPCR

Tableau 1. Concentration d'ADN dans les échantillons collectés avec le Coriolis µ

| Nom de l'échantillon | Type d'échantillon | Protocole de Collecte avec le Coriolis µ | Technique de concentration de l'échantillon | Concentration d'ADN (ng/µL) | Ct |
|---|---|---|---|---|---|
| COR1 | Intérieur | 300L/min,10min | Centrifugation | 0,9 | 26,04 ± 0,34 |
| COR2 | Intérieur | 300L/min, 20min | Centrifugation | 1,7 | 30,83 ± 0,70 |
| COR3 | Extérieur | 300L/min,10min | Filtration | 1,0 | 32,56 ± 1,05 |
| COR4 | Extérieur | 300L/min,10min | Centrifugation | 2,1 | 13,35 ± 0,21 |
| COR5 | Extérieur | 300L/min, 20 min | Centrifugation | 2,5 | 13,50 ± 0,08 |

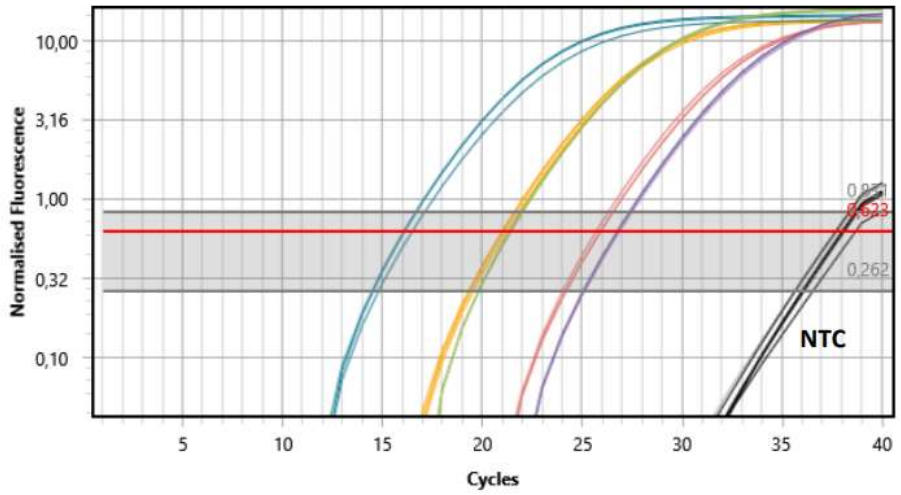


Figure 1: Amplification qPCR de l'ARNr 16S avec le PerfeCTa SYBR Green FastMix(QuantaBio).

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2023-32911 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs

Les PCR réalisées sur l'ADN bactérien obtenus à partir des échantillons des bioaérosols ont été très sensibles, au point que même des dilutions 100-fold des échantillons originaux ont pu être détectées. Les résultats de chaque PCR sont présents dans le Tableau 1 (valeurs de Ct, seuil de cycle). La valeur Ct du NTC (No template control) était de 35,99 ± 0,55.

Pour tous les échantillons (mis à part le NTC), l'amplification du fragment de 466bp du gène codant pour l'ARNr 16S a aussi été confirmée grâce à un gel d'électrophorèse (Figure 2).

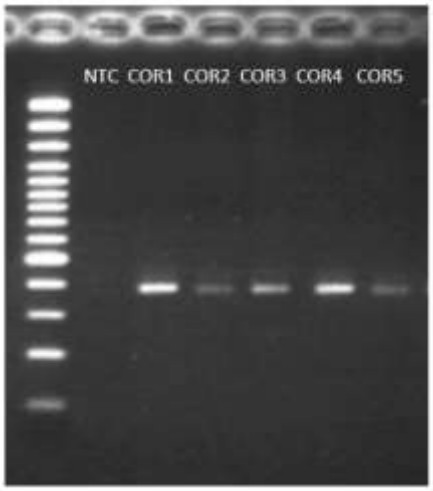


Figure 2: Image du gel d'électrophorèse obtenus à partir des échantillons collectés avec le Coriolis µ

## 3. CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude illustrent comment optimiser et valider un protocole de détection de l'ADN bactérien en utilisant le Coriolis µ. De plus, cela permet d'identifier des recommandations clés pour optimiser le rendement en ADN bactérien :

- Pour la méthode de concentration des échantillons, la technique de centrifugation est plus efficace que la technique de filtration
- L'augmentation de la durée de prélèvement des échantillons a bien un impact positif sur la concentration d'ADN bactérien total obtenue, particulièrement en cas de collecte en intérieur.

DOI : 10.25576/ASFERA-CFA2023-32911 Cet article est publié sous la seule responsabilité de ses auteurs