

BioBank BB-0033-00072

livret - Conseil

Détection de mycoplasmes (Mollicutes) dans des cultures cellulaires

Avantage d'un test qPCR universel

Audrey Jean, Isabelle Grosjean, Bariza Blanquier, Florence Tardy & Denis Gerlier



Résumé

De 10 à 35 % des lignées cellulaires sont contaminées par les mycoplasmes (ou Mollicutes). Cette classe de micro-organismes est une source majeure de détérioration de la qualité des lignées cellulaires et d'invalidité de résultats expérimentaux obtenus avec celles-ci. Qu'en est-il des lots de stocks de virus ? Sont-ils testés aussi rigoureusement et régulièrement ?

Fort logiquement, les journaux scientifiques de premier plan exigent la mention « vérification de l'absence de contamination par des mycoplasmes » lors de travaux obtenus avec des lignées cellulaires et/ou des produits dérivés.

Ce livret-conseil compare 4 techniques de détection de mycoplasme : la qPCR Myco16S universelle (Brevet 15302MC), la coloration Indirecte au Hoechst et deux kits commerciaux (MycoAlert, et Plasmotest).

La supériorité qualitative et quantitative de la qPCR Myco16S mise au point par le CRB CelluloNet et la plateforme ANIRA d'analyse génétique de la SFR BioSciences de Lyon est illustrée comme l'est aussi sa meilleure pertinence pour vérifier l'absence de mycoplasmes dans des d'échantillons biologiques requérant un niveau de biosécurité BSL2, BSL3 ou BSL4.

Principes et protocoles de chaque technique sont détaillés. Les avantages et inconvénients de chacune de ces techniques sont également présentés. Une version synthétique a été publiée dans Plos One en 2017.

SOMMAIRE

Sommaire	1
Abréviations	1
Table des illustrations	2
Figures.....	2
Photos.....	3
Tableaux.....	4
Préface	5
MycoAlert™	10
Présentation.....	10
Avantages/Inconvénients.....	10
Méthode.....	12
A. Réactifs.....	12
B. Matériels.....	12
C. Cas d'utilisation d'un Luminomètre à tube.....	12
D. Cas d'utilisation d'un Luminomètre à microplaque.....	12
E. Résultats.....	13
F. Interprétation.....	13
PlasmoTest™	14
Présentation.....	14
Avantages/Inconvénients.....	14
Méthode.....	15
A. Réactifs.....	15
B. Matériels.....	15
C. Utilisation de Pathogène de niveau 2 (P2).....	16
D. Utilisation de Pathogène de niveau 3 et 4 (P3 et P4).....	16
E. Lecture et Interprétation.....	17
Coloration Indirecte au Hoechst	19
Présentation.....	19
Avantages/Inconvénients.....	19
Méthode.....	21
A. Réactifs.....	21
B. Matériels.....	21
C. Jour 1 : Préparation des cellules.....	21
D. Jour 0 ou 1 : Mise en co-culture de l'échantillon.....	22
E. Jour 5 ou 6 : Préparation des lames de lecture.....	22
F. Lecture et Interprétation.....	23
G. Autres exemples de résultats en fonction de la lignée indicatrice.....	25
qPCR ou PCR quantitative	28
Présentation.....	28
Avantages/Inconvénients.....	37
Préparation des contrôles nécessaires.....	38
Méthode A : Extraction d'ADN génomique de mycoplasmes.....	39
A. Réactifs.....	39
B. Matériels.....	39
C. Préparation des échantillons.....	39
D. Pré-lyse des échantillons.....	39
E. Lyse des échantillons.....	40
F. Conditions de liaison de l'ADN pour la colonne de silice.....	40
G. Liaison de l'ADN.....	40
H. Lavage de la membrane de silice.....	40
I. Séchage de la membrane de silice.....	40

J. Elution de l'ADN de haute pureté.....	40
K. Conservation.....	40
Méthode B : qPCR Mollicutes/ mycoplasmes.....	41
A. A partir des extraits d'ADN et des 2 contrôles plasmidiques congelé à -20°C précédemment en méthode A et B.Réactifs.....	41
B. Matériels.....	41
C. Préparation des Mélanges Réactionnels (Master Mix).....	41
D. Préparation de la plaque qPCR.....	42
E. Programmation de l'appareil de mesure qPCR.....	43
F. Analyse des données qPCR.....	43
G. Cas d'un résultat dit « faiblement positif ».....	50
Méthode C : Confirmation des statuts des échantillons.....	51
A. Réactifs.....	51
B. Matériels.....	51
C. Gel de migration électrophorétique.....	51
D. Interprétations.....	52
E. Préparation pour l'identification de la souche de mycoplasme contaminante.....	52
F. Recommandations importantes.....	52
Méthode D : Identification de la souche contaminante.....	53
A. Réactifs.....	53
B. Matériels (avec comme exemple MWG Eurofins génomics comme prestataire de séquençage de type Sanger).....	53
C. Préparation des échantillons à séquencer.....	53
D. Préparation des amorces dégénérées à envoyer.....	54
E. Commander et Envoyer : exemple d'un laboratoire à Lyon.....	55
F. Analyses des résultats et identification de la souche de mollicute.....	57
Elimination des contaminations	60
Table des Fiches Mémos	61
Choix des Techniques adaptées selon la nature des d'échantillons	62
MycoAlert™	63
PlasmoTest™ (L2)	64
PlasmoTest™ (L3 et L4)	65
Coloration Indirecte au Hoechst	66
PCR Quantitative : étapes	67
Amplification des plasmides contrôles p_GFP & p_m16S(9,5kb)	68
A. Réactifs.....	68
B. Matériels.....	68
C. Amplification des plasmides p_GFP et p_m16S(0,9kb) (respectivement ADN traceur et contrôle positif de la qPCR).....	69
qPCR : Extraction d'ADN génomique	72
qPCR GFP & 16S mycoplasmes	73
qPCR : Analyse courbes de fusion	74
Arbre de Décision dans l'Analyse qPCR	75
qPCR GFP & 16S mycoplasmes : Echantillon faiblement positif	76
Purification des produits qPCR	77
Tables des Annexes	78
Brevet N°15302MC	81
Publication	81
Bibliographie	106

ABREVIATIONS

A. : <i>Acholeplasma</i> (genre de Mollicutes)	Kb : Kilobase(s)
AB : Antibiotique	L : Litre(s)
ADN ou DNA : Acide Désoxyribonucléotide	L2, L3, L4 : Classe de confinement 2, 3 ou 4
ADNg : ADN génomique	LB : Luria Broth
ADP : Adénosine Diphosphate	LOD : Limit of Detection
AniRA : Animal Rhône-Alpes	M. : <i>Mycoplasma</i> (genre de Mollicutes)
ANR : Agence Nationale de la Recherche	min : Minute(s)
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement Travail	mL : Millilitre(s)
ARN : Acide Ribonucléotide	MRA : Mycoplasma Removal Agent
ARNr 16S : ARN ribosomique 16S	Mycoplasmas : Terme usuel pour Mollicutes.
ATP : Adénosine Triphosphate	NaPy : Sodium Pyruvate
BBP : Bleu de Bromophénol	N.B : <i>Nota Bene</i>
BBPG : Bleu de Bromophénol + Glycérol	NCBI : National Center of Biotechnology Information
BF : Bruit de Fond	ND : Non digéré
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool	NEaa : Non-Essential Amino Acid
BLASTn : Nucleotide BLAST	NF-κB : Facteur de transcription
bp ou pb : Base pairs ou paire(s) de bases	nm : Nanomètre(s)
BSL : Biosafety Level	OGM : Organisme Génétiquement Modifié
C : Cytosine (nucléotide)	pb ou bp : Paire(s) de bases ou Base pairs
°C : Degrés Celsius	P2, P3, P4 : Pathogène de classe 2, 3 ou 4
CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement	PBS : Phosphatase Buffered Saline
CFU : Colony Forming Unit	PCR : Polymerase Chain Reaction
CIAP : Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal	PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
CIRI : Centre International de Recherche en Infectiologie	Q : Quantité
CO₂ : Dioxyde de carbone	QA : Quantité Arbitraire
Cq : Cycle quantitative	qPCR : quantitative PCR ou Real-Time PCR
CRB : Centre de Ressource Biologique	QR : Quantité Relative
ΔCq : Différence de Cq entre contrôle positif et échantillon	R99 : amorce anti-sens du couple GFP
D : Digéré	rec. : recombinant
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole	rpm : rotation per minute
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	RPMI : Roswell Park Memorial Institut medium
dNTPs : mélange des quatre désoxyribonucléotides A, T, C et G	s : seconde(s)
E : Efficacité	sAP : secreted Alkalin Phosphatase
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique	SFR : Structure Fédérative de Recherche
EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium	SN : Surnageant
F1 : amorce sens du couple GFP	SOC : Super Optimal Broth
Fd : Facteur de dilution	SVF : Sérum de Vœu Foetal
g ou rcf : Force Centrifuge	TA : Température Ambiante
G : Guanine (nucléotide)	TAE : Tris, Acétate EDTA
GFP : Green Fluorescent Protein	TLR2 : Toll Like Receptor 2
GlutaMAX™-I : substitut de la L-glutamine	Tm : melting Temperature (température de fusion)
h : Heure(s)	U1 : amorce sens du couple Myco16S
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	U8 : amorce anti-sens du couple Myco16S
IBISA : Infrastructure en Biologie Santé et Agronomie	UMR : Unité Mixte de Recherche
INRA : Institut Nationale de la Recherche Agronomique	US : Unité de Service
IVCP : Infections Virales et Pathologie Comparée	U.V. : Ultra-Violet
	V : Volt(s)
	vec. : vecteur
	VIGIMY : Réseau National d'épidémiologie surveillance des mycoplasmoses des ruminants (France)
	μL : Microlitre(s)

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 - Classification des mycoplasmes (mollicutes) selon la base de données NCBI.....	6
Figure 2 - Organisation d'un mycoplasme.....	7
Figure 3 - Sensibilité du test MycoAlert™ sur une série de dilution des souches <i>M. hyorhinitis</i> , <i>M. orale</i> et <i>A. laidlawii</i>	10
Figure 4 - Cascade de réaction pour la sécrétion de sAP.....	14
Figure 5 - Exemple de courbes d'amplification en vue linéaire.....	28
Figure 6 - Exemple de courbe de fusion.....	32
Figure 7 - Arbre de décision analytique depuis la purification de l'ADN d'un échantillon jusqu'à l'interprétation des résultats obtenus.....	33
Figure 8 - Présentation des phases dans la procédure d'analyse des courbes de fusions.....	34
Figure 9 - Présentation des phases dans la procédure d'analyse des courbes d'amplification.....	34
Figure 10 - qPCR mycoplasmes/mollicutes : variation du Tm pour différentes séquences de mycoplasmes détectées.....	35
Figure 11 - Alphabet dégénérée du code génétique.....	35
Figure 12 - qPCR mycoplasmes/mollicutes : exemple de courbe de fusion du contrôle négatif (eau), du contrôle positif p_m16S(0,9kb) et d'échantillons à faible copie.....	36
Figure 13 - Validation du couple d'amorce dégénérées, nommé « Myco16S » : mesure de l'efficacité d'amplification par régression linéaire d'une série de dilutions.....	31
Figure 14 - Procédure de positionnement du seuil de détection.....	44
Figure 15 - Profils positif et nondétectable des courbes de fusion contrôles pour le gène GFP.....	44
Figure 16 - Exemple montrant les 5 profils de courbes de fusion possibles pour le gène 16S de l'ADN de mycoplasme.....	37
Figure 17 - Condition d'envois des amorces pour le séquençage.....	54

Photos

Photo 1 - Exemple de résultats d'un test Plasmotest.....	18
Photo 2 - Photo d'un résultat négatif (à gauche) et d'un résultat positif (à droite) de la présence de colonies mycoplasmes, sur la lignée cellulaire MeWo, détectées par la technique de la Coloration Indirecte au Hoechst.....	19
Photo 3 - Résultat Négatif (cellules MeWo).....	23
Photo 4 - Résultat Positif (cellules MeWo).....	23
Photo 5 - Cellules MeWo.....	25
Photo 6 - Cellules MeWo.....	25
Photo 7 - Cellules VERO.....	25
Photo 8 - Cellules VERO.....	25
Photo 9 - Cellules CHO.....	26
Photo 10 - Cellules CHO.....	26
Photo 11 - Cellules NIH3T3.....	26
Photo 12 - Cellules MeWo.....	27
Photo 13 - Cellules MeWo.....	27
Photo 14 - Etiquettes prépayées.....	54
Photo 15 - Etiquettes paiement différé.....	54
Photo 16 - Ouverture du compte MWG Eurofins genomics.....	55
Photo 17 - Etapes d'ouverture de la commande de demande de séquençage.....	56
Photo 18 - Etapes pour compléter la commande de séquençage.....	56
Photo 19 - Analyse du séquençage et corrections d'erreurs de lecture.....	58
Photo 20 - Conditions pour lancer un blastn : recherche de séquences nucléotidique des mollicutes.....	59
Photo 21 - Exemple de résultat d'une souche la plus rapprochée de notre séquence inconnue.....	59

Tableaux

Tableau 1 - Présentation des résultats MycoAlert.....	13
Tableau 2 - Liste (non exhaustive) des lignées cellulaires utilisables pour la technique de Coloration Indirecte au Hoechst.....	22
Tableau 3 - Séquences d'amorces représentées par la dégénérescence du couple Myco16S.....	36
Tableau 4 : Organisation du gel électrophorétique de la purification de l'insert et du vecteur digéré.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 5 : Organisation du gel électrophorétique de la sélection des clones d'intérêts avec le plasmide mère p_m16S (1,5 kb) « Miniprep ».....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 6 : Organisation du gel électrophorétique de la sélection des clones d'intérêts avec la plasmide mère p_m16S (1,5 kb) « Midiprep ».....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 7 : Organisation du gel électrophorétique de la purification du vecteur recombinant p_m16S (1,5 kb) digéré.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 8 : Organisation du gel électrophorétique de la sélection des clones d'intérêts avec le plasmide contrôle qPCR p_m16S(0,9kb) « Miniprep ».....	70
Tableau 9 : Organisation du gel électrophorétique de la sélection des clones d'intérêts « Midiprep ».....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 10 - Composants du Mélange Réactionnel Myco16S de qPCR.....	42
Tableau 11 - Composants du Mélange Réactionnel GFP de qPCR.....	42
Tableau 12 - Conditions du programme de la qPCR pour la détection d'ADN mycoplasmique.....	43
Tableau 13 - Profils des 5 courbes de fusion possible pour la détection du gène 16S de l'ADN de mycoplasme.....	46
Tableau 14 - Troubleshooting de l'analyse de qPCR.....	48

PREFACE

Les cellules en culture sont un outil de choix pour la recherche en biologie, et leur qualité est déterminante pour la fiabilité et la reproductibilité des observations expérimentales. Outre l'authentification correcte des lignées cellulaires, l'absence de leur contamination par des micro-organismes de type mycoplasmes est un enjeu majeur. Paradoxalement, dans les laboratoires académiques, les contaminations de cellules et/ou de souches virales par des mycoplasmes sont encore trop souvent négligées et/ou non-mentionnées.

Ce livret-conseil est dédié aux méthodes applicables à la détection et/ou à la quantification des mycoplasmes dans des cultures cellulaires ou des échantillons infectieux de classe de biosécurité 2, 3 ou 4. Il a été élaboré dans le cadre d'un contrat de recherche soutenu par l'Infrastructure Nationale BIOBANQUES (IBiSA & ANR) et mené au sein de la SFR BioSciences (UMR3444/US8, INSERM, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Univ Lyon) par Audrey JEAN, Isabelle GROSJEAN, Denis GERLIER (CRB CelluloNet) et Bariza BLANQUIER (plateforme AniRA Analyse Génétique) avec la collaboration de :

- ❖ Florence TARDY, ANSES, Agence National de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Laboratoire de Lyon, UMR mycoplasmoses des ruminants, et Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy l'Etoile, France.
- ❖ Christine PEREIRA, Joanna BRUNEL et Cyrille MATHIEU, équipe Branka HORVAT, CRB-Measles, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Immunologie des Infections Virales, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Jonathan HOFFMANN, Marie MOROSO et Milen MILENKOV, équipe Glauca PARAHNOS-BACCALA, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Laboratoire des Pathogènes Emergents, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Fondation Mérieux, Lyon, France.
- ❖ Yoann SAUCEREAU, Margot ENGUEHARD, équipe Dimitri LAVILLETTE et équipe Fabienne ARCHER, UMR 754, Rétrovirus et Pathologie Comparée ; et équipe Patrick MAVINGUI, UMR 5557, Dynamique Microbienne et Transmission Virale, AniRA-Laboratoire L3, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Lyon, France.
- ❖ François GUIGUEN, équipe Christophe TERZIAN, UMR 754, Infections Virales et Pathologie Comparée, AniRA-Laboratoire L3, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Lyon, France.
- ❖ Laetitia LINES et Irène PILA-CASTELLANOS, équipe Vincent LOTTEAU et Patrice ANDRE, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Biologie Cellulaire des Infections Virales, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Sandrine ALAIS, équipe Renaud MAHIEUX, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Oncogenèse Retrovirale, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Olivier REYNARD, équipe Viktor VOLCHKOV, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Bases Moléculaire de la Pathogénicité Virale, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Stéphanie REYNARD, équipe Sylvain BAIZE, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Institut Pasteur, Lyon, France.

- ❖ Véronique BARATEAU, équipe Andréa CIMARELLI, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Interactions Hôte-Pathogène lors de l'Infection Lentivirale, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Elodie DECEMBRE, équipe François-Loïc COSSET, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Virus Enveloppés, Vecteurs et Immunothérapie, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Stéphane MELY et Delphine PANNETIER, équipe Hervé RAOUL, Laboratoire P4 Jean Mérieux – INSERM, US3, Lyon, France.
- ❖ Didier DECIMO, équipe Théophile OHLMANN, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Contrôle Traductionnel des ARNm Eucaryotes et Viraux, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Henri GRUFFAT, équipe Evelyne MANET, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Herpesvirus Oncogènes, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Yvonne BENITO, Laetitia BERAUD, équipe François VANDENESCH, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Pathogénie des Staphylocoques, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.
- ❖ Omran ALLATIF CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENS Lyon, Université Lyon 1, Lyon, France.

Le terme « mycoplasme » est le nom usuel du genre *Mycoplasma*, famille des *Mycoplasmataceae*, ordre des *Mycoplasmatales*, classe des *Mollicutes*, et division des *Tenericutes* (Figure 1). Ce terme de mycoplasme sera utilisé comme nom générique dans ce présent document.

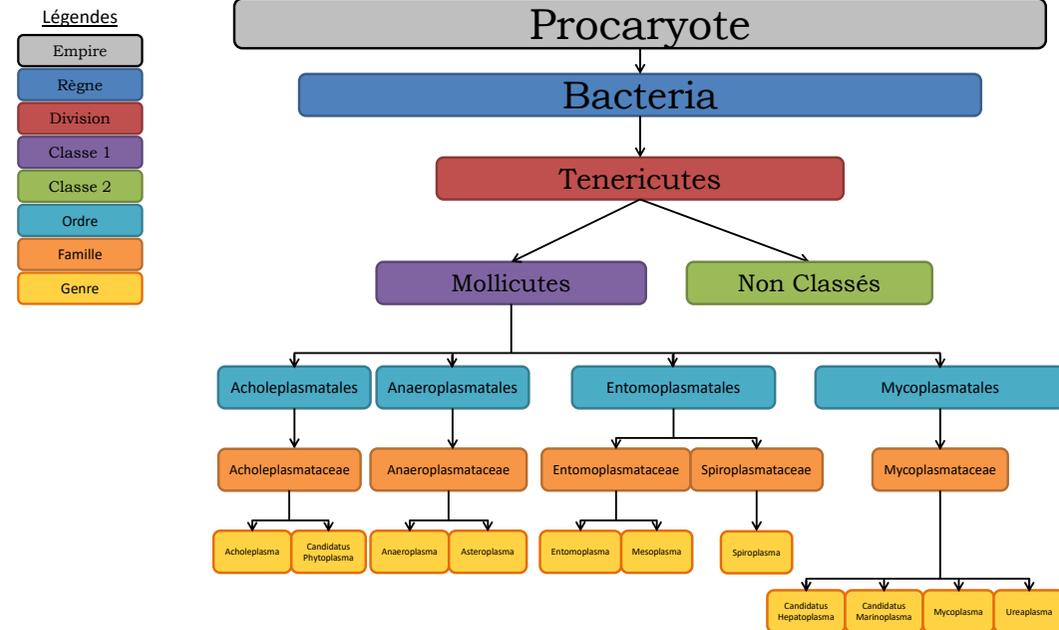


Figure 1 - Classification des mycoplasmes (mollicutes) selon la base de données NCBI.

(1) Caractéristiques des Mollicutes

D'après des études phylogéniques construites à partir de la région la plus conservée chez les procaryotes : l'ARN ribosomique 16S ou ARNr 16S, la classe des mollicutes a été établie. Ces mollicutes seraient apparus après évolution dégénérative d'une bactérie Gram positive possédant un génome à faible teneur en bases G/C (Guanine/Cytosine). L'hypothèse de cette dégénérescence est orientée sur la perte de nucléotide(s) et de gène(s) dont les premiers perdus sont nécessaires à la biosynthèse de la paroi bactérienne. Le dernier ancêtre commun des mollicutes est très proche des espèces *Clostridium innocum* et *Clostridium ramosum* [1].

Ces micro-organismes sont pléiomorphes car dépourvus de paroi cellulaire. De petite taille allant de 0,10 µm à 0,80 µm, ils sont des parasites d'êtres pluricellulaires : plantes, insectes, animaux et les êtres humains. Ils sont composés d'une membrane cytoplasmique, de ribosomes et d'un tout petit génome d'environ 1-2 mégabases comportant 500 à 1000 gènes à ADN double brin circulaire (Figure 2). Ils sont donc plus petits que certains virus géants ou *Megaviridae*. Certains mycoplasmes sont pathogènes ou peuvent être pathogènes (exemples : *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*).

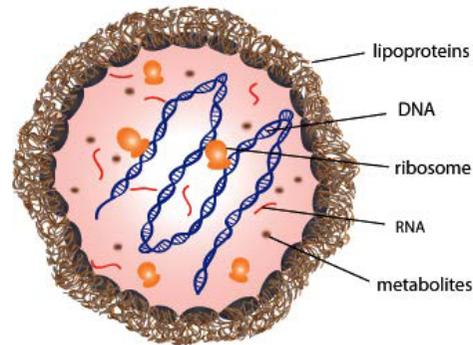


Figure 2 - Organisation d'un mycoplasme (source : <http://www.invivogen.com/review-coplasma>)

(2) Histoire des Mollicutes

Depuis la découverte du premier mycoplasme en 1898 [2], les mollicutes sont une menace permanente de contamination invisible au microscope optique pour les biologistes cellulaires. Un taux de contamination des expériences de biologie cellulaire de 11 %, a été estimé à partir des transcriptomes référencés dans la base de données des archives « NCBI Sequence Read Archive ». Cette contamination par des mycoplasmes, non rapportée par les auteurs des études archivées, est pourtant associée à une signature transcriptomique portant sur 61 gènes cellulaires [3,4] : cela montre l'impact majeur de ce parasite sur les fonctions cellulaires et remet en cause la validité des observations expérimentales rapportées.

Les premières cibles de contamination par des mycoplasmes sont les cultures de cellules primaires, les lignées cellulaires ou encore les échantillons de tissu en culture, avec respectivement un taux de contamination de 15% aux USA, 28% en Allemagne et 70% en Argentine [3]. Seulement 6 espèces de mollicutes sont responsables de 90 à 95% des cas de contamination de lignée cellulaire rapportés : *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma fermentans*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma orale* et *Mycoplasma arginini*.

La contamination par les mollicutes représente une source majeure de détérioration de la qualité des cellules, de non reproductibilité de résultats expérimentaux et d'erreurs d'interprétation des données. Cette contamination peut être détectée et évitée grâce à des outils diagnostiques et curatifs existants. Les coûts liés à ces contaminations sont considérables, tant du point de vue des ressources, des expériences inconclusives et de gâchis de main d'œuvre. C'est ainsi que plusieurs unités de recherche, entreprises ou équipes ont été dans l'obligation d'éliminer un grand nombre de lignées cellulaires contaminées.

Les mollicutes ont aussi un impact sanitaire préoccupant. En 2003, l'augmentation du nombre de maladies liées aux mycoplasmes dans l'agroalimentaire a justifié la mise en place d'une surveillance épidémiologique « VIGIMYC » sur le territoire français. Beaucoup d'experts des mycoplasmes ruminants et vétérinaires alertent sur la courbe de l'évolution des mycoplasmes, qui se développe de façon fulgurante [5]. En effet, il a été rapporté qu'une nouvelle espèce est découverte tous les 6 mois.

Malgré une première observation des mollicutes phytopathogènes des plantes en 1967, le genre *Candidatus Phytoplasma* (proche phylogénétiquement du genre *Acholeplasma*) reste le seul parmi la classe des *Mollicutes* dont la culture *in vitro* n'est pas possible. Une surveillance sanitaire spécifique de chaque phytopathogène est possible grâce à des tests de PCR. En dehors de la destruction du végétal infecté, le contrôle des phytoplasmes est difficile à cause de l'absence de méthode curative préservant le végétal et de phénomènes de résistance [6,7].

(3) Mycoplasmes, cellules et virus : état des lieux en France

Au démarrage de ce projet, la majorité des équipes de recherches de la SFR BioSciences de Lyon pratiquaient uniquement la technique de détection MycoAlert™, d'une part sur des surnageants de culture avant infection de cellule par un virus, et, d'autre part, plus rarement sur des souches virales. Pour une minorité d'équipes, aucun test de détection systématique n'était utilisé, ni pour les lignées cellulaires, ni sur les stocks de virus.

Pour compléter nos informations sur les pratiques mises en place dans cadre du contrôle qualité des échantillons biologiques, nous avons réalisé une enquête auprès des CRB membres de l'infrastructure nationale BIOBANQUES. Sur les 23 CRB ayant répondu, 2/3 des CRB sont concernés par la détection des mycoplasmes dans leurs échantillons. Parmi eux, 1/3 rencontrent des problèmes liés aux méthodes de détection disponibles : faux-négatifs (kit MycoAlert™, société Lonza), absence « ponctuelle » de contrôle positif (kit PCR Venor®GeM OneStep, société Minerva), ou encore résultats douteux et faible sensibilité de détection (méthode qPCR SYBR Green optimisée par Stormer et al. [8]).

(4) Ambition du projet initial et évolution

Avant cette étude, il n'existait pas de test de détection universel, fiable et techniquement utilisable en laboratoire de recherche confiné. Par conséquent, il était nécessaire de recourir à deux techniques de détection des mycoplasmes pour couvrir un plus large spectre de souches existantes [9].

De nombreuses méthodes de détection sont disponibles [10] : culture en milieu gélosé spécifique (méthode de référence ou « Gold Standard »), coloration directe ou indirecte de l'ADN microbien extranucléaire au Hoechst, kit enzymatique MycoAlert™, ELISAs ou encore kits de PCR ou qPCR. À part les deux premières, ces techniques ne permettent de détecter qu'un nombre restreint de souches de mollicute, laissant échapper ainsi nombre d'autres espèces de mollicutes.

Fort de ce constat et pour pallier à l'ensemble de ces lacunes, nous avons développé une nouvelle technique de PCR quantitative permettant la détection et la quantification des mollicutes, et, si nécessaire, l'identification des souches contaminantes. De plus cette technique devait être applicable à des échantillons de virus pathogènes quelque soit le degré de confinement requis. Nous avons postulé que les paires d'amorces dégénérées « universelles », amplifiant 1,5kb de la région d'ARNr 16S des mollicutes [11], puissent être utilisées en PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR).

(5) Objectif de ce Livret-conseil

Ce livret-conseil a vocation d'orienter le choix du test à mettre en œuvre pour détecter des mycoplasmes selon le niveau d'exigence souhaité. Il se propose d'informer sur quatre techniques de détection des mycoplasmes. Ces méthodes ont été expérimentalement testées et leur fiabilité respectives comparées par l'analyse d'un échantillonnage de cultures cellulaires, bactériennes et virales de niveau de biosécurité BSL2, BSL3 et BSL4.

Ces méthodes sont :

- kit MycoAlert™ (société LONZA) : test biochimique basé sur une enzyme spécifique de mollicute.
- kit Plasmotest™ (société InvivoGen) : test colorimétrique fonctionnel basé sur la détection des glycopeptides de l'enveloppe des mollicutes par le senseur moléculaire TLR2 exprimé à la surface d'une cellule rapportrice.
- Coloration Indirecte au Hoechst basée sur l'amplification des colonies de mycoplasmes en culture sur cellules reportrices, suivie d'une visualisation en microscopie à fluorescence des colonies microbiennes dont l'ADN rendu fluorescent est visible en périphérie des cellules repérables grâce à leur noyau également fluorescent.
- qPCR universelle ciblant la région de l'ARNr 16S de mollicute.

Note : Malgré sa très grande sensibilité, la technique « gold standard » de recherche de mycoplasmes par culture sur milieu gélosé a été volontairement exclue de notre analyse. En effet cette méthode est fortement déconseillée dans un laboratoire de culture cellulaire à cause du risque majeur de dissémination accidentelle et, en pratique, inapplicable pour des échantillons biologiques requérant un niveau de biosécurité L2, L3 ou L4.

MYCOALERT™

Présentation

La technique du MycoAlert™ (société LONZA) est un test biochimique, basé sur l'activité enzymatique de certains mycoplasmes à convertir l'ADP (*Adénosine DiPhosphate*) en ATP (*Adénosine TriPhosphate*). Une première étape d'addition du réactif permet de lyser les mycoplasmes, d'ajouter une luciférase au milieu réactionnel consommatrice d'ATP et d'obtenir le niveau d'ATP (valeur A) présent dans un échantillon biologique tel qu'un surnageant cellulaire clarifié. La seconde étape d'addition de réactif entraîne la conversion de l'ADP en ATP par l'enzyme du mycoplasme, suivi de la mesure de l'ATP ainsi généré par l'émission de bioluminescence par la luciférase (valeur B) :



Le ratio (B/A) donne l'indication de présence (valeur >1,2) ou d'absence (valeur <0,9) de mycoplasmes dans l'échantillon testé.

Avantages/Inconvénients

Le test MycoAlert™ est pratique et facile d'utilisation, à partir d'un surnageant de culture cellulaire clarifié par centrifugation douce (5 min à 200 x g) et de la consommation de 2 réactifs. Cette méthode requiert un luminomètre pour effectuer les mesures (A et B). Le résultat est obtenu dans les 30 minutes après le début de l'expérience et son interprétation est simple : ratio <0,9, le test est non détectable ; ratio >1,2, le test est positif ; 0,9 < ratio < 1,2, le test est douteux. Dans ce dernier cas, l'expérience doit être refaite sur un nouveau prélèvement effectué après prolongation d'un ou deux jours de la culture cellulaire. Le doute peut être aussi levé en utilisant une autre technique de détection.

Cette méthode ne donne pas d'indication sur la viabilité des mycoplasmes présents dans les échantillons testés. La sensibilité du test dépend de la souche de mycoplasme, et, nous n'avons pas pu confirmer la sensibilité du test MycoAlert™ pour l'espèce *A. laidlawii*, telle qu'annoncée par le fournisseur (Figure 3). Ce test ne serait donc optimal dans sa sensibilité que pour certaines souches et en respectant d'autres paramètres non définis, comme la provenance, la méthode de préparation et les conditions de stockage de l'échantillon.

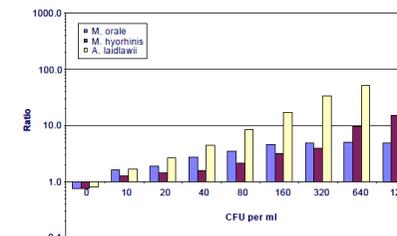


Figure 3 – Sensibilité du test MycoAlert™ sur une série de dilution des souches *M. hyorhina*, *M. orale* et *A. laidlawii*.
(Source : Fiche Technique du test MycoAlert, LONZA)

Enfin, fort de son expérience de ce test utilisé en complément de la technique de Coloration Indirecte au Hoechst pendant plusieurs années, le CRB CelluloNet a été confronté à de faux-négatifs avec le test MycoAlert™. La présence de résultats faux-négatif peut être liée à la limite de détection de 50 CFU/mL (d'après la fiche d'information du fabricant en 2011) et/ou à une validation du kit MycoAlert™ sur seulement 44 des plus de 200 espèces de Mollicutes existantes, *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma*, *Ureaplasma*, etc. (Figure 1)



Méthode

TO = 30 min

Le MycoAlert peut être effectué sur :

- ✓ des surnageants de cellules en culture clarifiés (5 min à 200 x g)
- ✓ des échantillons biologiques infectieux (lot de virus)
- ✓ des surnageants conservés sans limite à -80°C (**condition idéale**)
- ✓ des surnageants conservés au maximum 1 mois à -20°C
- ✓ des surnageants conservés au maximum 3 jours à 4°C
- ✓ des surnageants récemment décongelés.

Le MycoAlert est inadapté pour une recherche de mycoplasmes dans :

- X des surnageants conservés plus de 3 jours à 4°C
- X des surnageants conservés plus d'un mois à -20°C.
- X des culots cellulaires

A. Réactifs

- Aliquotes des constituants du kit MycoAlert™ conservés à -20°C : Réactifs (R), Substrat (S), contrôle positif (+) et le contrôle négatif dilué au 1/10^{ème} (-).
- Echantillons à tester : surnageants de culture clarifiés par centrifugation (5 min à 200 x g) ou surnageant viral et stockés dans des cryotubes à -80°C !

B. Matériels

- Luminomètre : à tube ou à plaque.
- Chronomètre.
- Pour luminomètre à tube : tubes à hémolyse, en polypropylène ou polystyrène, à fond rond, de 5 mL sans bouchon et/ou avec bouchon (ex : BD Falcon, cat. no. 352053 + 352032)
- Pour luminomètre à plaque : microplaque 96 puits, fond plat, en polystyrène, opaque, avec/sans couvercle ou film adhésive transparent (ex : Grosseron, cat. no. CG3912 ou CG3615).

Attention ! Ne pas chauffer l'échantillon pour éviter de dégrader l'enzyme cible des mycoplasmes pour ce test de détection.

Vortexer chacune des solutions (réactifs et échantillons) puis centrifuger le tout pour obtenir une solution complète et homogène !

C. Cas d'utilisation d'un Luminomètre à tube

- 1) Identifier les tubes de réaction des surnageants et des contrôles.
- 2) Distribuer 90 µL de Réactif dans tous les tubes.
- 3) Ajouter 90 µL d'échantillon à tester ou de Contrôle positif ou de Contrôle négatif.
- 4) Attendre 5 minutes, mesurer la luminescence donnant une première valeur A et la noter.
- 5) Ajouter 90 µL de Substrat.
- 6) Attendre 10 minutes et mesurer la luminescence donnant la seconde valeur B et la noter.

D. Cas d'utilisation d'un Luminomètre à microplaque

- 1) Identifier la plaque de réaction des surnageants et des contrôles.
- 2) Distribuer 50 µL de Réactif dans tous les tubes.
- 3) Ajouter 50 µL d'échantillon à tester ou de Contrôle positif ou de Contrôle négatif.
- 4) Attendre 5 minutes, mesurer la luminescence donnant une première valeur A et la noter.
- 5) Ajouter 50 µL de Substrat.
- 6) Attendre 10 minutes et mesurer la luminescence donnant la seconde valeur B et la noter.

E. Résultats

- 7) Calculer pour chaque échantillon et contrôles le rapport des valeurs de B/A
- 8) Présenter et interpréter le résultat selon le tableau ci-dessous :

Tableau 1 - Présentation des résultats MycoAlert

Surnageants	Valeur A	Valeur B	Ratio B/A	Interprétation
Echantillon X				
Contrôle +				
Contrôle -				

F. Interprétation

a) Un rapport **B/A < 0,9** correspond à un test négatif, il y a absence de mycoplasme détectable par le kit (*attention cependant aux faux-négatifs*). Ce résultat correspond à une quantité de mycoplasmes **strictement inférieure** à une limite de détection de **50 CFU de mollicutes/mL**.

Exemple : le ratio B/A = 0,5. L'échantillon est < à 50 CFU/mL.

b) Un rapport **B/A > 1,2** correspond à un test positif, la contamination par les mycoplasmes est confirmée. Ce résultat correspond à une quantité de mycoplasmes **strictement supérieure** à une limite de détection de **50 CFU de mollicutes/mL**.

Exemple : le ratio B/A = 4. L'échantillon est > à 50 CFU/mL.

c) Un rapport **0,9 < B/A < 1,2** correspond à un résultat douteux, il sera nécessaire d'effectuer un nouveau test après 24h de culture supplémentaire ou de lever l'ambiguïté en utilisant une autre technique de détection.

ATTENTION !

Le fabricant réévalue occasionnellement les limites inférieures et supérieures du rapport B/A. Les valeurs limites indiquées ci-dessus datent de 2016. Il est donc conseillé de vérifier les valeurs des limites inférieures (0,9) et supérieures (1,2), une fois par an.

PLASMOTEST™

Présentation

La technique du Plasmotest™ (société InvivoGen) est un dosage colorimétrique basé sur la détection de la phosphatase alcaline sécrétée par les cellules HEK-Blue-2 lors de leur activation par des lipopeptides de mycoplasmes. La présence d'enzyme est détectée colorimétriquement par conversion d'un substrat qui de rose devient bleu. Ces cellules HEK-Blue-2 sont des cellules HEK293 OGM exprimant constitutivement le récepteur TLR2 (*Toll Like Receptor 2*). TLR2 reconnaît les lipopeptides de la famille des Mollicutes (mycoplasmes), et autres micro-organismes du règne bactérien. Au contact d'extrait de mycoplasmes (**Figure 4**), une cascade de signalisation intracellulaire sous le TLR2, aboutit à l'activation du facteur de transcription NF-κB, médiateur de l'activation d'un promoteur artificiel contrôlant la sécrétion de phosphatase alcaline (*secreted Alkaline Phosphatase* ou sAP).

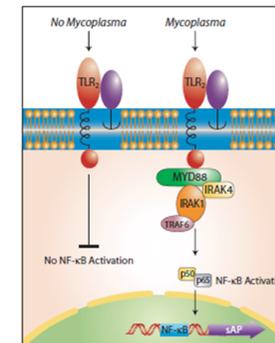


Figure 4 - Cascade de réaction pour la sécrétion de sAP
(Source : Fiche technique du kit Plasmotest, InvivoGen)

Avantages/Inconvénients

Le Plasmotest™ est simple d'utilisation pour un laboratoire équipé pour la culture cellulaire, et ne nécessite aucun équipement spécifique autre qu'un bloc chauffant atteignant 100°C. La lecture est faite soit par une simple observation oculaire, soit à l'aide d'un spectrophotomètre. En pratique, à partir des cellules en culture, il faut 1 heure pour effectuer le test et une nuit d'incubation.

L'examen des échantillons biologiques infectieux (virus P2 à P4) est aisé car l'étape préalable de chauffage des échantillons à 100°C pendant 15 minutes est validée comme protocole d'inactivation de virus de niveau 3 et 4 pour sortir les échantillons de la zone confinée.

En revanche, de facto, cette méthode ne donne pas d'indication sur la viabilité des mycoplasmes présents dans les échantillons testés.

La sensibilité du kit est réputée dépendre de la souche de mycoplasme détectée, avec une limite de détection entre 5.10² CFU/mL pour Mycoplasma fermentans à 5.10⁵ CFU/mL pour Mycoplasma orale.



Méthode

T0 = une nuit et 1 heure

Le Plasmotest peut être effectué sur :

- ✓ des surnageants de cellules en culture clarifiés (5 min à 200 x g)
- ✓ des échantillons biologiques infectieux (lot de virus)
- ✓ des surnageants conservés sans limite à -80°C (**condition idéale**)
- ✓ des surnageants conservés au maximum 1 mois à -20°C
- ✓ des surnageants conservés au maximum 3 jours à 4°C
- ✓ des surnageants récemment décongelés.

Le Plasmotest *est inadapté* pour une recherche de mycoplasmes dans:

- X des surnageants conservés plus de 3 jours à 4°C
- X des surnageants conservés plus d'un mois à -20°C.
- X des culots cellulaires.

A. Réactifs

- **Echantillons à tester** : surnageants de culture clarifiés par centrifugation (5 min à 200 x g) ou surnageant viral et stockés dans des cryotubes à -80°C !
- **Cellules** : HEK-Blue™-2 (InvivoGen, cat. no. rep-pt1) en culture.
- PBS 1X stérile à TA.
- Bleu Trypan ou autre colorant d'exclusion.
- **Solution de HEK-Blue Selection** (InvivoGen, cat. no. rep-pt1 ou rep-ptrk) : solution concentrée à 250 X et conservée sous forme d'aliquotes de 200 µL à -20°C. Utiliser à 1X final pour le milieu de culture de Sélection.
- **Eau HEK-Blue** : solution utilisée pour restituer le contrôle positif, le contrôle négatif et le milieu de culture de détection. Conserver à 4°C.
- **Contrôle Positif/Négatif** (InvivoGen, cat. no. rep-pt1 ou rep-ptrk) : solution restituée avec 1 mL d'eau HEK-Blue dans chacun des tubes fournis dans le kit. Obtention d'une solution concentrée à 10 X. Vortexer vigoureusement. Conserver sous formes d'aliquotes de 50 µL, concentrée à 1X.
- **Milieu de culture dit « Complet »** : DMEM à 4,5 g/L de glucose, rouge de phénol, 1% NaPy, 10% SVF et 1X de Normocin (stock à 500X).
- **Milieu de culture dit « de Sélection »** : milieu de culture pour la maintenance des cellules HEK-Blue-2 = milieu « Complet » contenant de la solution HEK-Blue Selection 1X.
- **Milieu de culture dit « de Détection »** (InvivoGen, cat. no. rep-pt1 ou rep-ptrk) : milieu de culture utilisé lors du test Plasmotest. Verser le contenu du sachet dans une bouteille stérile de 250 mL. Ajouter 50 mL d'eau HEK-Blue fourni dans le kit. Filtrer le milieu réalisé avec un filtre d'une membrane de 0,22 µm dans une nouvelle bouteille stérile de 250 mL. Conservation sous forme d'aliquotes de 2 mL à -20°C.

B. Matériels

- Spectrophotomètre (**Facultatif**) : lecteur de microplaques avec filtre de 630 nm.
- Incubateur 37°C avec 5% CO₂.
- Bloc chauffant microtubes thermostaté (100°C).

Attention ! Le test doit être effectué avec des cellules HEK-Blue-2 collectées impérativement après au moins 48 heures de culture et à partir d'une monocouche dont le pourcentage de confluence est compris entre 50 et 80%.

Vortexer chacune des solutions (réactifs et échantillons) puis centrifuger le tout pour obtenir une solution complète et homogène !



C. Utilisation de Pathogène de niveau 2 (P2)

a) Préparation des échantillons

- 1) Transférer 200 µL d'échantillon à tester dans un tube de 1,5 mL conique et fermer hermétiquement les microtubes à l'aide de cavaliers.
- 2) Chauffer les échantillons dans le bloc thermostaté à 100°C précisément pendant 15 min.
- 3) Laisser refroidir quelques minutes à T (possibilité d'utiliser le réfrigérateur).

a) Déposer les échantillons/contrôles

- 4) Vortexer chaque échantillon et contrôle avant le dépôt sur plaque.
- 5) Ajouter 50 µL d'échantillon, de contrôle positif ou de contrôle négatif par puits dans une plaque 96 puits et en duplicata.

b) Suspension cellulaire HEK-Blue-2

- 6) Observer les cellules. La confluence des cellules HEK-Blue-2 doit être entre 50 à 80%.
- 7) Récupérer 3 mL de surnageant (SN) de culture dans un tube 15 mL et éliminer le reste.
- 8) Rincer soigneusement les cellules avec du PBS 1X. (**Attention !** les cellules se décollent facilement de leur support).
- 9) Décoller les cellules avec 3 mL de PBS 1X par jet de pipette.
- 10) Homogénéiser la suspension cellulaire par cycle d'aspiration et de refoulement doux en évitant la formation de bulles, puis l'ajouter aux 3 mL de SN de culture gardé dans le tube 15 mL.
- 11) Déterminer la concentration cellulaire viable au Bleu Trypan (ou autre colorant d'exclusion).
- 12) Réaliser une suspension cellulaire entre 1 et 3,5.10⁵ cellules/mL (idéalement 2,5.10⁵ cellules/mL). Homogénéiser par douce aspiration/refoulement.
- 13) Centrifuger 5 min à 200 x g. Éliminer le SN et ajouter le volume nécessaire de solution de Milieu de Détection.
- 14) Ajouter 200 µL de cette suspension cellulaire dans chaque puits de la plaque 96 puits contenant soit l'échantillon, soit le contrôle positif, soit le contrôle négatif (utilisation d'une pipette multicanaux ou monocanal). Ajouter 200 µL de cellules HEK-Blue-2 dans deux puits vides (duplicata).
- 15) Incuber la plaque à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 16 à 24 heures.

N.B. : La taille du prélèvement peut être supérieure à 50 µL d'échantillon en adaptant en conséquence la taille des puits et l'inoculum cellulaire (plaque 48 puits, 24 puits ou 12 puits).

D. Utilisation de Pathogène de niveau 3 et 4 (P3 et P4)

N.B. : La simplicité de lecture du test et l'étape d'inactivation préalable à 100°C pendant 10 minutes de l'échantillon a testé, permet son utilisation soit en zone confinée élevée, soit en zone BSL2 après sortie des échantillons inactivés.

a) Suspension cellulaire HEK-Blue-2 (Laboratoire L2)

- 16) Observer les cellules. La confluence des cellules HEK-Blue-2 doit être entre 50 à 80%.
- 17) Récupérer 3 mL de surnageant (SN) de culture dans un tube 15 mL et éliminer le reste.
- 18) Rincer soigneusement les cellules avec du PBS 1X. (**Attention !** les cellules se décollent facilement de leur support).
- 19) Décoller les cellules avec 3 mL de PBS 1X par jet de pipette.

- 20) Homogénéiser la suspension cellulaire par cycle d'aspiration et de refoulement doux en évitant la formation de bulles, puis l'ajouter aux 3 ml de SN de culture gardé dans le tube 15 mL.
- 21) Déterminer la concentration cellulaire viable au Bleu Trypan (ou autre colorant d'exclusion).
- 22) Réaliser une suspension cellulaire entre 1 et 3,5 x 10⁵ cellules/mL (idéalement 2,5 x 10⁵ cellules/mL). Homogénéiser par douce aspiration/refoulement.
- 23) Centrifuger 5 min à 200 x g. Eliminer le SN et ajouter le volume nécessaire de solution de Milieu de Détection.

N.B. : La taille du prélèvement peut être supérieure à 50 µL d'échantillon en adaptant en conséquence la taille des puits et l'inoculum cellulaire (plaque 48 puits, 24 puits ou 12 puits).

a) Préparation des échantillons (Laboratoire L3 ou L4)

- 24) Conserver le tube de cellules à l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂.
- 25) Transférer 200 µL d'échantillon à tester dans un tube de 1,5 mL conique et fermer hermétiquement les microtubes à l'aide de cavaliers.
- 26) Chauffer les échantillons dans le bloc thermostaté à 100°C précisément pendant 15 min.
- 27) Laisser refroidir quelques minutes à TA (possibilité d'utiliser le réfrigérateur).

c) Déposer les échantillons/contrôles (L3 et L4)

- 28) Vortexer chaque échantillon et contrôle avant le dépôt sur plaque.
- 29) Ajouter 50 µL d'échantillon, de contrôle positif ou de contrôle négatif par puits dans une plaque 96 puits et en duplicata.

d) Mise en culture (L3 et L4)

- 30) Ajouter 200 µL de la suspension cellulaire d'HEK-Blue-2 dans chaque puits de la plaque 96 puits contenant soit l'échantillon, soit le contrôle positif, soit le contrôle négatif (utilisation d'une pipette multicanaux ou monocanal). Ajouter 200 µL de cellules HEK-Blue-2 dans deux puits vides (duplicata).
- 31) Incuber la plaque à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 16 à 24 heures.

E. Lecture et Interprétation

Tous les contrôles doivent être conformes aux résultats attendus avant d'analyser et d'interpréter les échantillons.

- Coloration **rose** du milieu avec cellules HEK-Blue-2 seules, le contrôle est conforme au résultat attendu.
- Coloration **bleu** du contrôle positif, le contrôle est conforme au résultat attendu.
- Coloration **rose** du contrôle négatif, le contrôle est conforme au résultat attendu.

a) Lecture à l'œil nu

- Coloration **violet/bleu**, le test est positif, la contamination est confirmée.
- Coloration **rose foncé/violet clair**, le test est douteux, il faut confirmer par une lecture au spectrophotomètre.
- Coloration **rose**, le test est négatif, il y a absence de contamination par les mycoplasmes pour une détection avec ce kit.

e) Lecture semi-quantitative ou de confirmation

Lecture au spectrophotomètre de la plaque avec un filtre à 630 nm.
La limite inférieure des tests considérés comme positif, est égale à 3 fois la valeur obtenue pour le contrôle négatif.

f) Exemple d'interprétation et de résultats

***Mycoplasma hyorhinis* 293PR en dilution**

Colonne 1 : Contrôle positif et négatif

Colonne 2 : Surnageant de lignées cellulaires non infectées et infectées par *M. hyorhinis* 293PR

Colonne 3 : Surnageant de lignées cellulaires non infectées

Colonne 4 : Dilutions de surnageant de *M. hyorhinis* 293PR, permettant de juger la couleur d'interprétation d'un résultat. Le test est positif jusqu'au 3^{ème} puits, le 4^{ème} est douteux et à partir du 5^{ème} puits le test est négatif.



Photo 1 - Exemple de résultats d'un test Plasmotest

(Source : Fiche Technique du kit PlamoTest, InvivoGen)

COLORATION INDIRECTE AU HOECHST

Présentation

La technique de Coloration Indirecte au Hoechst est basée sur le marquage de l'ADN microbien et nucléaire avec visualisation au microscope à fluorescence. Sa lecture et sa sensibilité sont notablement accrues après une amplification de l'échantillon sur une lignée indicatrice en culture. C'est une méthode reconnue pour sa sensibilité et est l'une des deux techniques reconnues comme « Gold Standard » avec la culture en milieu gélosé spécifique.

Une première étape de co-culture de 3 à 7 jours fait l'intérêt du test, en utilisant la capacité des mycoplasmes à se multiplier sur les membranes externes ou à l'intérieur des cellules, dites « indicatrices ». La seconde étape consiste à fixer les cellules et marquer l'ADN avec une solution de Hoechst 33258. Cette coloration (fluorescence bleue) permet de distinguer les noyaux des cellules et les colonies de mycoplasmes si elles sont présentes dans la culture.

L'obtention du résultat se lit par observation au microscope droit à fluorescence, objectif x100, à huile, avec un filtre DAPI (excitation à 360 nm et émission à 490-500 nm). Le résultat s'interprète par rapport au contrôle négatif pour lequel seuls les noyaux des cellules sont marqués.

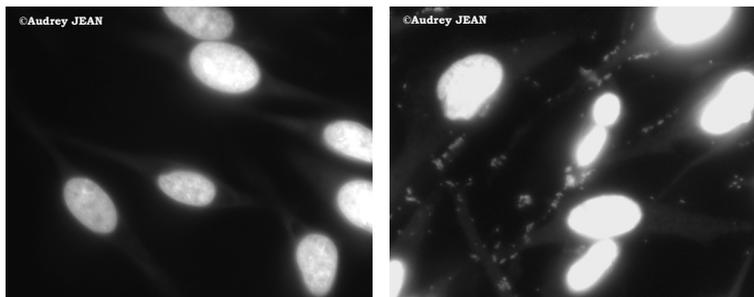


Photo 2 - Photo d'un résultat négatif (à gauche) et d'un résultat positif (à droite) de la présence de colonies mycoplasmes, sur la lignée cellulaire MeWo, détectées par la technique de la Coloration Indirecte au Hoechst.

Avantages/Inconvénients

La Coloration Indirecte au Hoechst est très sensible grâce à l'étape d'amplification des mycoplasmes de l'échantillon sur la lignée cellulaire indicatrice. CelluloNet réalise ce test après une amplification de 7 jours et utilise la ligne cellulaire MeWo (CelluloNet N°231) comme lignée cellulaire de référence. La taille et le nombre de colonies de mycoplasmes détectables varie selon l'importance de la contamination dans l'échantillon considéré, et une suspicion de contamination sévère peut être lue avant le délai de 7 jours.

Cette méthode est un test de détection simple à mettre en œuvre, basé sur la technique de culture cellulaire et l'utilisation d'un microscope droit équipé d'un objectif à huile, x 100 de bonne qualité. L'interprétation des résultats requiert cependant une observation attentive au microscope à la recherche des colonies de mycoplasmes visibles autour des noyaux des cellules,

par comparaison avec le contrôle négatif « cellules + milieu de culture seul » où seuls les noyaux cellulaires sont visibles.

Parmi les 4 méthodes décrites dans ce livret, la Coloration Indirecte au Hoechst est la seule technique à donner une indication sur la viabilité des mycoplasmes présents dans les échantillons.

Avant l'étape de fixation et de marquage au Hoechst 33258, l'opérateur s'assure de la conformité des cellules indicatrices en observant la morphologie des cellules dans les contrôles et les échantillons. Cette observation se fait au microscope inversé, en contraste de phase, objectif x10 ou x20. Dans le cas où, un élément présent dans l'échantillon perturbe de manière trop importante la morphologie et / ou la viabilité des cellules indicatrices, l'interprétation des résultats peut être difficile. Cet élément peut être, par exemple, un virus qui infecterait la lignée indicatrice et provoquerait un effet cytopathique important ou un antibiotique de sélection actif sur les cellules indicatrices malgré la dilution de l'échantillon ou encore un facteur de croissance occasionnant une prolifération cellulaire trop rapide.

Ainsi, l'utilisateur du test peut être amené à valider une lignée cellulaire indicatrice différente et mieux adaptée aux contraintes liées au type d'échantillon à tester. Le choix de la lignée répondra à des critères comme : indemne de contaminations, lignée cellulaire adhérente, robuste et facile à maintenir en culture, temps de doublement adapté au temps de culture et faible rapport nucléo-cytoplasmique.

*Dans les laboratoires de confinements BSL3 et BSL4, l'utilisation des lames et lamelles en verre est interdite pour des raisons de sécurité. Des essais menés avec des lamelles en plastique de type Ibidi (société Biovalley) n'ont pas donné de résultats concluants. Cette méthode n'est donc **pas utilisable** pour ce type d'échantillon. Par ailleurs, à cause d'un effet cytopathique, le test n'est souvent pas applicable à nombre d'échantillons de virus, faute de disposer d'une lignée cellulaire non permissive adaptée.*



Méthode

T0 = 5 à 7 jours et 3h30

Le test test de Hoechst peut être effectué sur :

- ✓ des surnageants de cellules en culture clarifiés (5 min à 200 x g)
- ✓ des échantillons biologiques infectieux (lot de virus)
- ✓ des surnageants conservés sans limite à -80°C (**condition idéale**)
- ✓ des surnageants conservés au maximum 1 mois à -20°C
- ✓ des surnageants conservés au maximum 3 jours à 4°C
- ✓ des surnageants récemment décongelés

Le test de Hoechst est *inadapté* pour une recherche de mycoplasmes dans :

- X des surnageants conservés plus de 3 jour à 4°C
- X des surnageants conservés plus d'un mois à -20°C

A. Réactifs

- **Echantillons à tester** : surnageant de culture de lignées cellulaires infectées ou surnageant viral, prélevés stérilement dans la culture et conservés à -80°C.
- **Lignée cellulaire indicatrice en culture** : la lignée indicatrice peut être MeWo (CelluloNet, N°231), VERO (CelluloNet, N°498), CHO (CelluloNet, N°559), NIH3T3 (CelluloNet, N°462) ou IgH-2 (CelluloNet, N°557).
- **Milieu de Culture** : adapté aux conditions de cultures spécifiques des différentes lignées utilisées.
- **Colorant d'exclusion** : bleu de Trypan (ou autre colorant)
- Trypsine-EDTA
- PBS 1X stérile
- **Fixateur** : solution de Paraformaldéhyde 4% en PBS 1X ou une solution 1/4 acide acétique mélangée avec 3/4 d'éthanol absolu.
- Solution de Hoechst 33258 concentrée à 1X (bis Benzimide, Sigma cat. no. B-2883) : reconstitué à 1 mg/mL dans du PBS 1X (Hoechst 33258 concentré à 500X) et conservé à -20°C sous forme d'aliquotes de 25 µL. Utiliser à 2 µg/mL final.
- Milieu de montage : FluorPrep (BioMérieux, cat. no. 75521) conservé à TA et à l'abri de la lumière, ou glycérol dilué au 1/2 en PBS 1X, conservé à TA.
- Eau stérile et propre

B. Matériels

- Flacons de culture T25cm²
- Plaque 6 puits à fond plat, stérile et équipée d'une lamelle en verre stérile/puits (Lamelles 22x22mm stérilisées par autoclavage)
- PSM type II
- Incubateur à 37°, 5% CO₂, humide
- Microscope droit à fluorescence avec un objectif à huile, X100
- Microscope inversé en contraste de phase avec un objectif X10 ou X20
- Chronomètre
- Pince extra fine stérile

C. Jour 1 : Préparation des cellules

Le travail doit s'effectuer sous un PSM de classe II.

a) Caractéristiques des lignées cellulaires

Le volume de **suspension cellulaire** (V_{cellules}) pour les puits d'une plaque 6 puits est de **2 mL/puits** et le volume ajouté d'**échantillon à tester** ($V_{\text{échantillon}}$) est de **200 µL/puits**. Dans le **Tableau 2** ci-dessous, sont indiquées les concentrations cellulaires nécessaires à l'étape 1. Cette valeur dépend de la lignée indicatrice choisie et des équipements utilisés.



Tableau 2 - Liste (non exhaustive) des lignées cellulaires utilisables pour la technique de Coloration Indirecte au Hoechst

Lignées cellulaires	Organismes	Conditions de culture	Concentration (cellules/mL)
MeWo	Humain	RPMI 1640 GlutaMAX™-I, 10% SVF, 1% NaPy/NEaa/HEPES 37°C avec 5%CO ₂	2 x 10⁴
VERO	Singe	DMEM GlutaMax-I, 10% SVF 37°C avec 5%CO ₂	4 x 10³
IgH-2	Iguane	EMEM 2mM GlutaMAX™ 10% SVF 1% NEaa 36-37°C avec 5%CO ₂	3 x 10³
NIH3T3	Souris	RPMI 1640 GlutaMAX™-I, 5% SVF 37°C avec 5%CO ₂	2 x 10³
CHO	Hamster	Ham's F-12 Nutrient Mixture 10% SVF 37°C avec 5%CO ₂	2 x 10³

b) Préparation des cultures de cellules indicatrices

Regarder les cellules en culture au microscope inversé pour vérifier leur morphologie, l'absence de contamination fongique ou bactérienne et le degré de confluence du tapis cellulaire. Décoller les cellules avec de la trypsine-EDTA et déterminer la concentration cellulaire.

En fonction du nombre de plaque 6 puits utilisés et suivant le type de lignée cellulaire choisie, calculer la dilution pour obtenir une suspension cellulaire suffisante pour remplir les puits nécessaires.

A l'aide d'une pince stérile, placer une lamelle stérile dans chaque puits à utiliser et ajouter 2 mL de suspension cellulaire/puits et suivre les indications présentes dans le **Tableau 2**.

D. Jour 0 ou 1 : Mise en co-culture de l'échantillon

Le travail s'effectue sous un PSM de classe II. Ajouter dans chaque puits du milieu de culture (= control négatif) ou de l'échantillon à tester. Puis incubé les cultures à 37°C sous 5% de CO₂.

E. Jour 5 ou 6 : Préparation des lames de lecture

Observer les cellules au microscope inversé puits par puits, vérifier l'état des cellules. On peut trouver des cellules mortes provenant des surnageants congelés ou, parfois, des cellules vivantes issues de surnageants non congelés et capables de se multiplier.

Utilisation d'un PSM de classe II

Les volumes des solutions de lavages, de fixation et de coloration au Hoechst doit être de **2 mL/puits**.

- 1) Aspirer les surnageants l'un après l'autre et les évacuer dans une poubelle déchets biologiques clairement identifiée « Tests Mycoplasmes ».
- 2) Réaliser un lavage des tapis cellulaire avec PBS 1X, puis éliminer.
- 3) Fixer (et perméabiliser) les cellules avec la solution de fixation. Incuber 10 minutes à TA.

A ce stade, le travail peut être effectué en dehors du PSM de classe II

- 4) Retirer la solution de fixation usagée (l'évacuation se fait dans une poubelle spécifique puis le liquide est éliminé dans les bidons adapté et prévu pour le ramassage des déchets chimiques).
- 5) Réaliser un lavage des tapis cellulaire avec PBS 1X, puis éliminer.
- 6) Ajouter la solution de Hoechst 33258 concentrée à 1X et incuber 10 minutes à TA. (l'évacuation se fait dans une poubelle spécifique puis le liquide est éliminé dans les bidons adapté et prévu pour le ramassage des déchets chimiques).
- 7) Réaliser 2 lavages des tapis cellulaire avec de l'eau propre.
- 8) Remettre 2 mL d'eau propre et préparer extemporanément les lames en identifiant les échantillons par un numéro.
- 9) Déposer sur la lame une goutte ($\approx 15 \mu\text{L}$) de milieu de montage.
- 10) Récupérer la lamelle dans le puits avec la pince extra fine.
- 11) Eponger la tranche de la lamelle sur un papier absorbant et la retourner (face contenant les cellules) sur la goutte présente sur la lame.
- 12) Observer au microscope droit à fluorescence muni d'un filtre DAPI et d'un objectif à huile, x100.

F. Lecture et Interprétation

a) Lecture : exemple de résultats positifs et négatifs

La coloration au Hoechst 33258 permet de colorer par fluorescence tous les acides nucléiques doubles brins fixés dans les puits de culture. On observe donc les noyaux des cellules et éventuellement des petits points correspondants aux colonies de mycoplasmes qui se sont amplifiées durant les 3 à 7 jours de co-culture sur les cellules indicatrices, voir exemple ci-dessous :

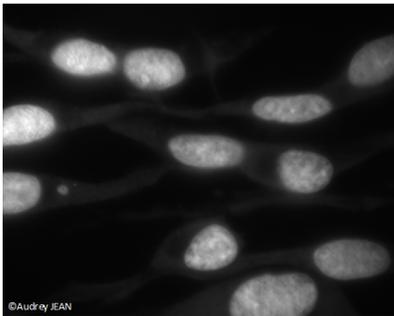


Photo 3 - Résultat Négatif (cellules MeWo)
Absence de colonies de mycoplasmes après vérification en 10 points de lames

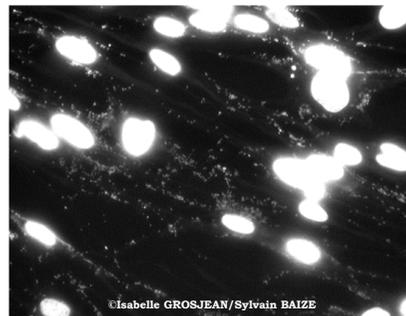


Photo 4 - Résultat Positif (cellules MeWo)
Présence de colonies de mycoplasmes

g) Interprétation : 3 possibilités

Lors des observations en **10 champs différents de chaque** lamelle, pensez à valider en premier le contrôle négatif puis trois conclusions sont possibles pour l'état de l'échantillon testé :

Contrôle négatif :

Cas A : En présence de la lignée indicatrice seule, les observations **correspondent** à l'image d'un **résultat négatif** comme ci-dessus, car il ne présente pas de colonies de mycoplasmes. Le **contrôle négatif est alors validé** et l'interprétation des résultats des échantillons peut être faite.

Cas B : En présence de la lignée indicatrice seule, les observations **ne correspondent pas** à l'image d'un **résultat négatif**, comme ci-dessus. Le **contrôle négatif n'est pas validé** et l'interprétation des résultats des échantillons est impossible (exemple : contamination du milieu de culture, état des cellules dégradées, etc.).

➤ **Refaire le test**

Echantillons :

Cas 1 : En présence de la lignée indicatrice et de l'échantillon, les observations correspondent au contrôle négatif. Il y a alors une **absence de contamination par les mycoplasmes** dans l'échantillon.

Cas 2 : En présence de la lignée indicatrice et de l'échantillon, les observations correspondent à l'image d'un résultat positif comme ci-dessus, car des colonies de mycoplasmes sont observées à la périphérie ou sur les membranes cellulaires. Il y a alors une **présence de contamination par les mycoplasmes**.

Cas 3 (rare) : En présence de la lignée indicatrice et de l'échantillon, les observations montrent l'apparition de colonies de mycoplasmes intracellulaires. L'image obtenue est donc différente de celles illustrées ci-dessus. Il y a alors une **présence de contamination par les mycoplasmes**.

Cas 4 : Les observations ne permettent pas de confirmer l'exactitude d'un résultat négatif ou d'un résultat positif. Le **test est alors ininterprétable**.

G. Autres exemples de résultats en fonction de la lignée indicatrice

Exemple avec la souche d'*Acholeplasma laidlawii*

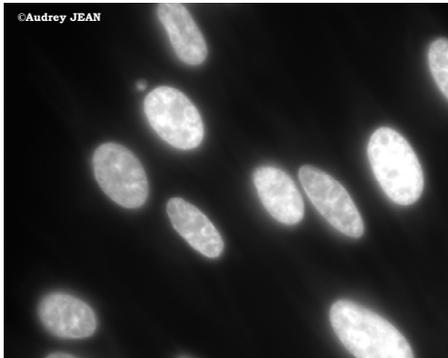


Photo 5 - Cellules MeWo
échantillon Négatif

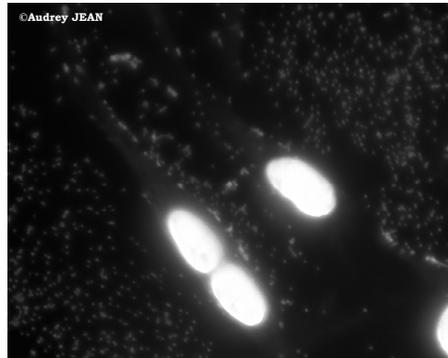


Photo 6 - Cellules MeWo
échantillon Positif

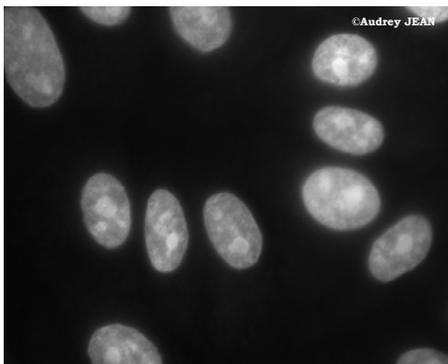


Photo 7 - Cellules VERO
échantillon Négatif

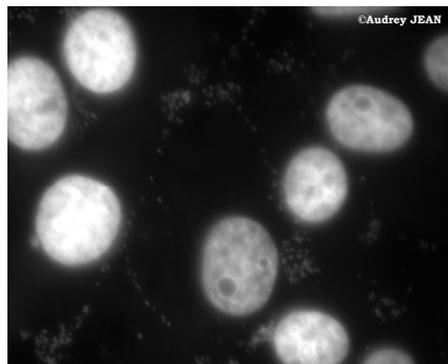


Photo 8 - Cellules VERO
échantillon Positif

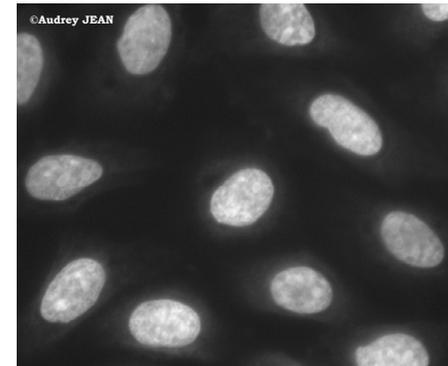


Photo 9 - Cellules CHO
échantillon Négatif

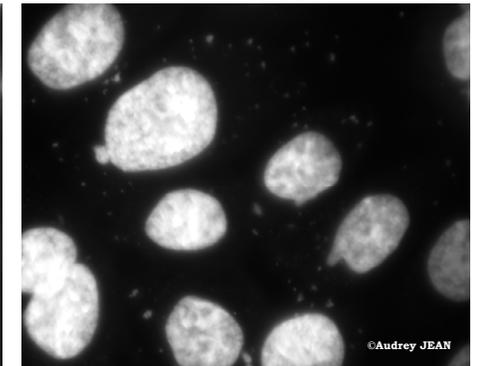


Photo 10 - Cellules CHO
Echantillon Positif

Pour un même échantillon de *A.laidlawii*, nous remarquons que les images obtenues sont différentes d'une lignée cellulaire à l'autre. Ce phénomène peut être expliqué par les différences propriétés cellulaires mis en jeu dans la technique de culture cellulaire (temps de doublement, morphologie, etc.).

Exemple avec d'autres souches de mycoplasmes (*Mollicutes*)

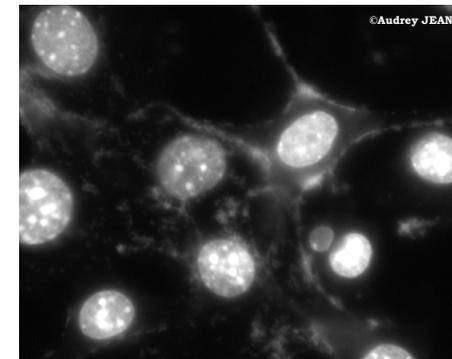


Photo 11 - Cellules NIH3T3
contaminée par la souche
Mycoplasma yeatsii

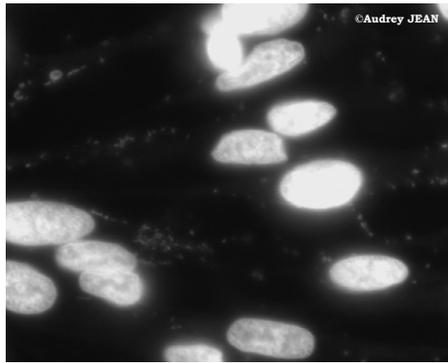


Photo 12 - Cellules MeWo contaminée par la souche *Mycoplasma arginini*

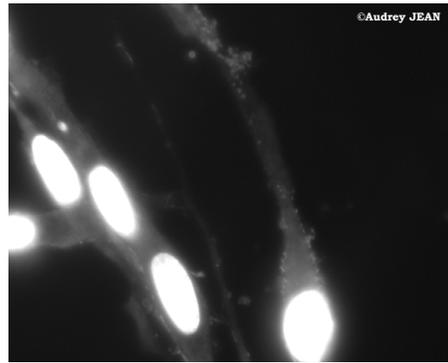


Photo 13 - Cellules MeWo contaminée par la souche souche *Mycoplasma hyorhinis*

Toutes les espèces de mollicutes rencontrées se caractérisent par le développement de colonies au contact de la membrane plasmique des cellules, sauf dans certains cas comme la souche *A.laidlawii*, qui se développe aussi bien à l'écart qu'autour de cellules (colonies isolées, **Photo 6**).

QPCR OU PCR QUANTITATIVE

Présentation

La technique de qPCR ou PCR quantitative repose sur le suivi et la détection, cycle par cycle, et donc en temps réel, du signal d'amplification grâce à un marqueur fluorescent [12, 13]. Ce marqueur peut être, soit une sonde signal spécifique, soit un marqueur du double brin ADN tel que le SYBR® Green I.

Le SYBR® Green I est un fluorophore qui devient fortement fluorescent lorsqu'il s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice de l'ADN. Cette liaison à l'ADN est réversible et permet de suivre les cinétiques d'amplification et les cinétiques de dissociation de la double hélice (mesurée par la T_m , température de fusion ou « melting temperature »).

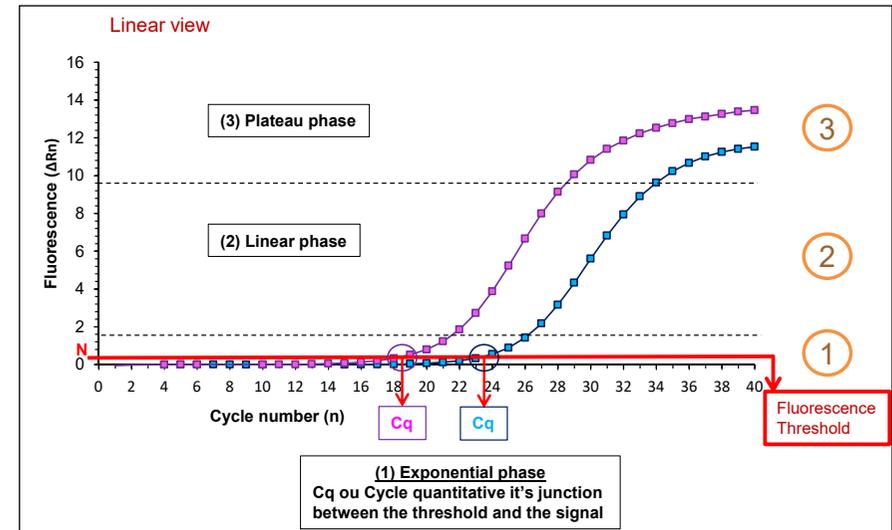


Figure 5 – Exemple de courbes d'amplification en vue linéaire.

(1) Cinétique d'amplification :

La fluorescence mesurée cycle par cycle est proportionnelle à la quantité d'ADN_{dtb} synthétisé (amplicon). On distingue classiquement trois phases dans la cinétique d'amplification : une phase exponentielle, une phase linéaire et enfin une phase plateau où la quantité d'ADN reste constante quel que soit le nombre de cycles (épuisement du milieu réactionnel ou phénomène de saturation : fin de la PCR).

1.1 Efficacité (E)

Dans la phase exponentielle, on observe un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle selon la formule :

$$N = N_0 \times 2^n$$

Où **N** correspond à la quantité d'ADN à **n** cycle(s),
N₀ correspondant à la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon,
n correspond au nombre de cycle où le signal est détecté,
2 correspond à l'Efficacité (E) théorique.

L'Efficacité d'amplification est un facteur clé de la qPCR car il a un impact non négligeable sur les quantifications. En théorie, à partir d'une copie d'ADN, après un cycle d'amplification, on devrait obtenir deux copies. Dans ce cas, on dit que l'efficacité d'amplification est de 100% ou égale à 2. L'efficacité d'amplification va dépendre d'un grand nombre de paramètres (chimie, thermocycleurs, matrice d'ADN, etc). Dans un système expérimental donné, l'efficacité sera dépendante du couple d'amorces. Il est donc indispensable de vérifier et de valider une efficacité d'amplification proche de 100% pour chacun des couples d'amorces d'un projet de quantification par qPCR (Figure 6 et Figure 7). Cette efficacité peut être mesurée en régression linéaire d'une série de dilution de 7 à 10 log. La pente de la droite obtenue sur le nombre de cycles en fonction de la concentration d'ADN en log, permet de calculer l'efficacité :

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$

Cette gamme d'efficacité permet également de déterminer la linéarité, la dynamique et la limite de détection (LOD) des amorces.

1.2 Seuil de détection

C'est uniquement dans la phase exponentielle que l'on observe un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle, c'est donc uniquement dans cette phase que la quantification est possible. On positionnera donc sur la cinétique d'amplification, un seuil de détection qui doit croiser le début de cette phase (Figure 5) : l'intersection entre la cinétique et ce seuil définit un cycle de quantification (Cq). La valeur de Cq est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN présente initialement dans l'échantillon avant amplification (**N₀**), selon la formule :

$$N_0 = E^{-Cq}$$

Où **N₀** correspondant à la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon,
E correspond à l'Efficacité (E) réelle du couple d'amorce utilisé,
Cq correspond au nombre de cycle où le signal est détecté.

Ainsi, plus l'échantillon sera concentré en ADN, plus le nombre de cycles nécessaire pour détecter la fluorescence sera petit. Le nombre de cycles où la fluorescence est détectée sera donc inversement proportionnel à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon [14].

Pour nos quantifications qPCR, le modèle mathématique de Pffafel [12] est utilisé avec la correction par l'efficacité réelle des amorces.

La qPCR a été développée en utilisant les amorces dégénérées U1 et U8 décrites par Johansson et al. [11]. Pour garantir une normalisation conforme des résultats, un autre couple d'amorce a été nécessaire, ciblant une petite région d'une séquence d'ADN GFP ajouté à chaque échantillon et contrôle testé.

Les Figure 6 et Figure 7 montrent la validation des couples d'amorces GFP et Myco 16S :

- le graphique A représentent les courbes de fusion ou cinétiques de dissociation (voir partie **Cinétique de dissociation** ci-dessous) indiquant le signal de détection de l'ADN cible (respectivement GFP et Myco 16S).
- le graphique B correspond aux cinétiques d'amplification.
- le graphique C montre la droite de régression linéaire.

Caractéristiques du couple d'amorces dégénérées Myco 16S :

Efficacité = 1,83870

Limite de détection (LOD) = 19 copies

Caractéristiques du couple d'amorces GFP :

Efficacité = 1,99136

Limite de détection (LOD) = 2,7 x 10⁵ copies

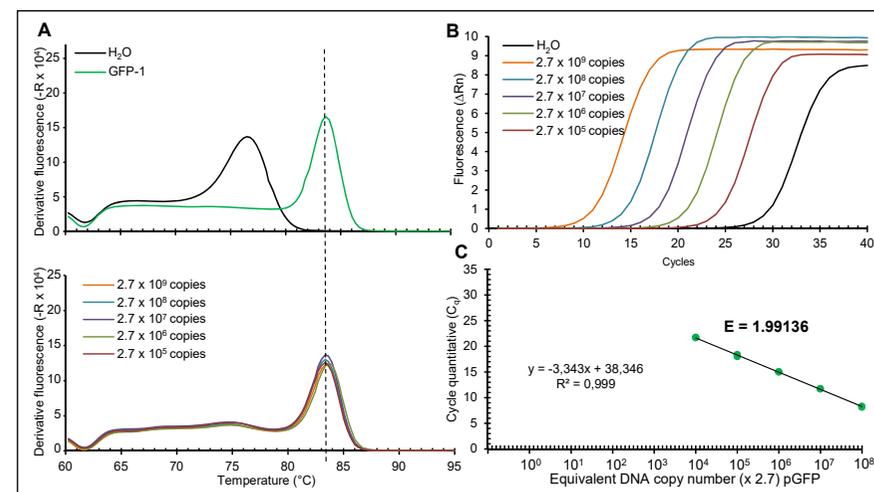


Figure 6 - Validation du couple d'amorce, nommé « GFP » : mesure de l'efficacité d'amplification par régression linéaire d'une série de dilutions.

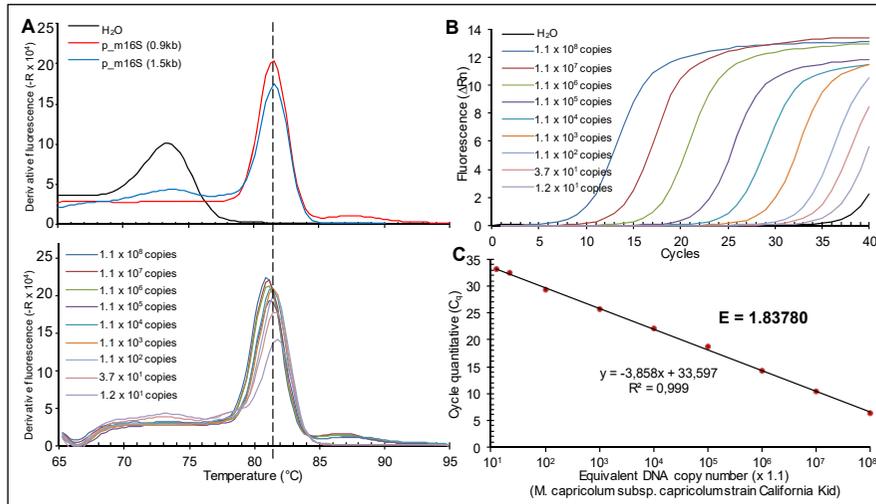


Figure 7 - Validation du couple d'amorce dégénérées, nommé « Myco16S » : mesure de l'efficacité d'amplification par régression linéaire d'une série de dilutions.

(2) Cinétique de dissociation :

La spécificité d'amplification en SYBR® Green I est caractérisée/contrôlée au cours d'une étape supplémentaire de la PCR par le suivi de la courbe de dissociation des amplicons d'ADN. Les amplicons obtenus après les 40 cycles de PCR sont chauffés selon un gradient de température progressif régulier de 60°C à 95°C. Cela entraîne un relargage progressif du SYBR® Green I objectivée par une diminution de la fluorescence selon une cinétique de dissociation qui permet de mesurer très précisément la T_m du produit amplifié.

La T_m caractérise une séquence donnée : elle dépend de sa taille, de sa composition en bases et de la concentration en sels du milieu réactionnel.

L'étude de la courbe de fusion est informative (Figure 8). Elle permet en effet d'identifier toute autre amplification non spécifique, que ce soit dans l'échantillon (T_m différent du produit cible) ou dans le contrôle négatif « eau » (contamination ou dimérisation des amorces).

De plus, cette courbe de fusion sert également de contrôle qualité du système d'amplification : toutes erreurs liées à la mise en œuvre de la qPCR se traduiront par une modification des T_m attendues (ex : erreur de préparation des mélanges réactionnels, dégradation des échantillons, contaminants dans l'échantillon d'ADN perturbant l'activité de la polymérase).

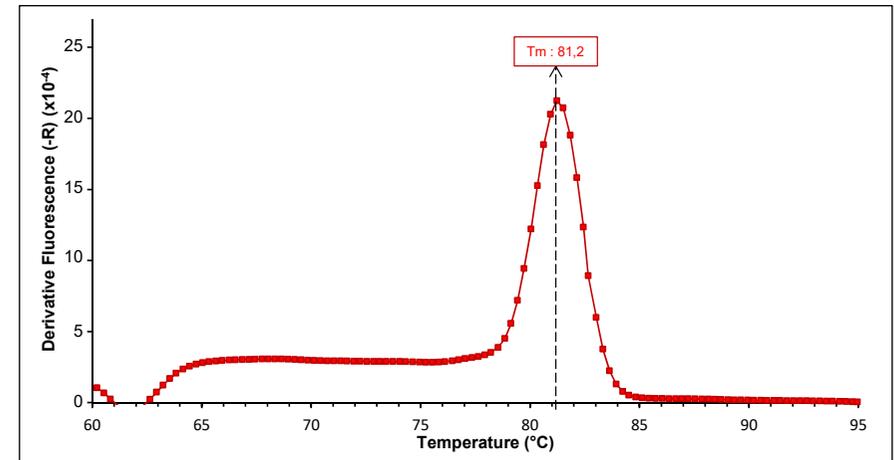


Figure 8 - Exemple de courbe de fusion.

Ce livret propose une nouvelle technique de qPCR permettant la détection et la quantification des mollicutes (mycoplasmes). L'originalité de cette méthode rapide et très sensible est de permettre la détection universelle de toutes les espèces de mollicutes et leur quantification, complétées si nécessaire, par l'identification de la souche par séquençage.

Le gène cible est la région 16S de l'ARN ribosomique. Cette séquence d'environ 1500 bp hautement conservée chez les procaryotes est la plus utilisée dans les études de phylogénie et donc, indispensable pour l'identification des espèces des mollicutes.

Le caractère universel de la méthode repose sur l'utilisation d'amorces dégénérées en mesure d'amplifier tous les génotypes des mollicutes : *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Ureaplasma* ou encore *Mycoplasma*.

Cette technique suit un arbre de décision analytique présenté dans la Figure 9 et détaillées dans les Figure 10 et Figure 11.

Brièvement, il est effectué dans l'ordre :

- Préparation de l'échantillon (extraction d'ADN génomique en présence de l'ADN traceur plasmide-GFP ou p_GFP).
- Evaluation de la qualité de l'extraction d'ADN avec quantification de la sonde ADN GFP en qPCR et l'observation de la courbe de dissociation (T_m) afin de détecter la présence de contaminant inhibiteur de la réaction de PCR.
- Détection et quantification de l'amplicon 16S mollicute/mycoplasme (qPCR).
- Confirmation du statut de l'échantillon (migration sur gel électrophorèse).
- Préparation de l'ADN pour le séquençage.

(F) Identification du mollicute par recherche d'identité de séquence par BLAST.

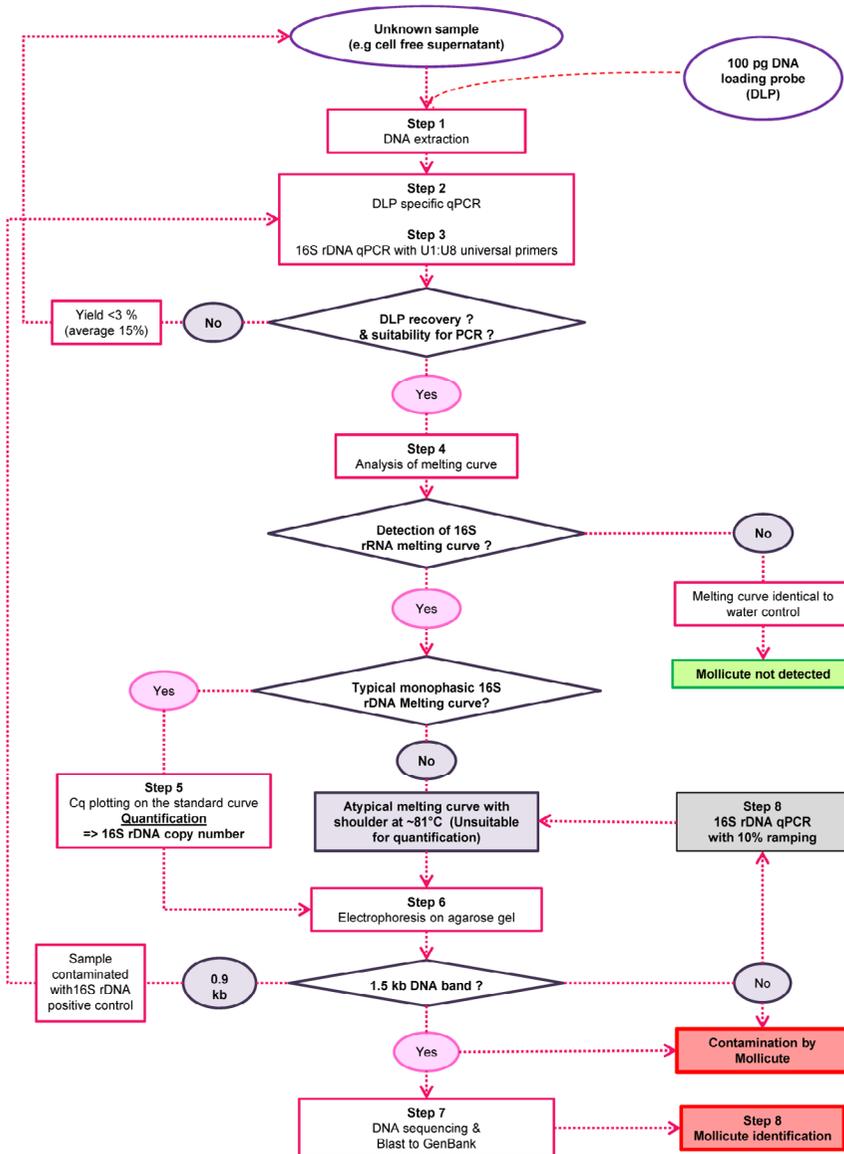


Figure 9 - Arbre de décision analytique depuis la purification de l'ADN d'un échantillon jusqu'à l'interprétation des résultats obtenus.

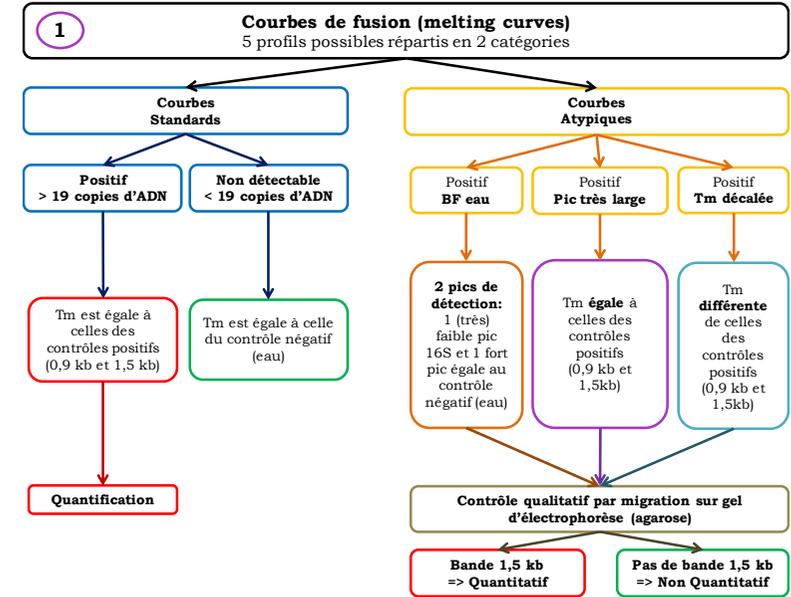


Figure 10 - Présentation des phases dans la procédure d'analyse des courbes de fusions.

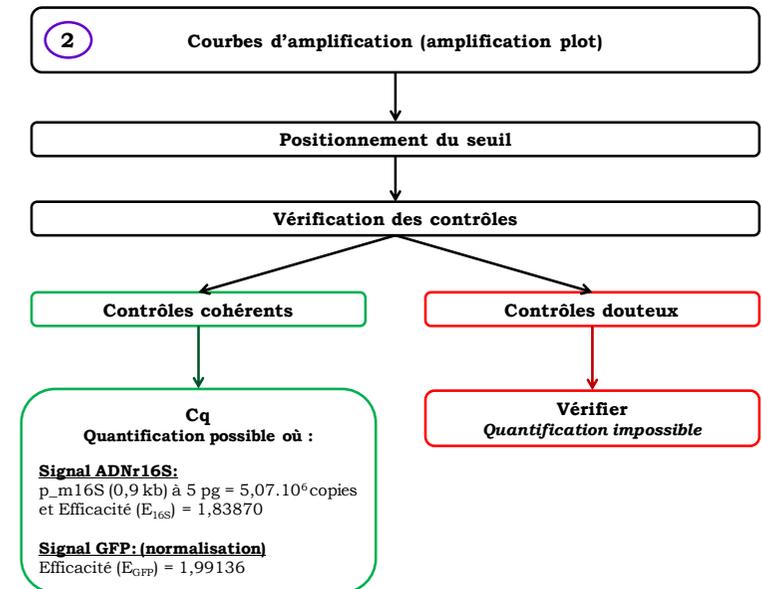


Figure 11 - Présentation des phases dans la procédure d'analyse des courbes d'amplification.

(3) Analyse de la courbe de fusion

Cette qPCR comporte deux particularités la différenciant d'une qPCR classique la très grande taille de l'amplicon (1,5 kb) et l'utilisation d'un double mélange d'amorces dégénérées. Elle nécessite une analyse rigoureuse et adaptée des courbes de fusion.

3.1 La taille de l'amplicon

La taille de l'amplicon est largement supérieure à la taille habituellement recommandée (60 à 200 bp en moyenne). De ce fait, on observe sur un amplicon de 1 500 bp une très faible variabilité des T_m mesurées (comprises entre 79,3°C et 83,1°C) selon la souche de mycoplasme incompatible avec une identification de l'espèce (Figure 12).

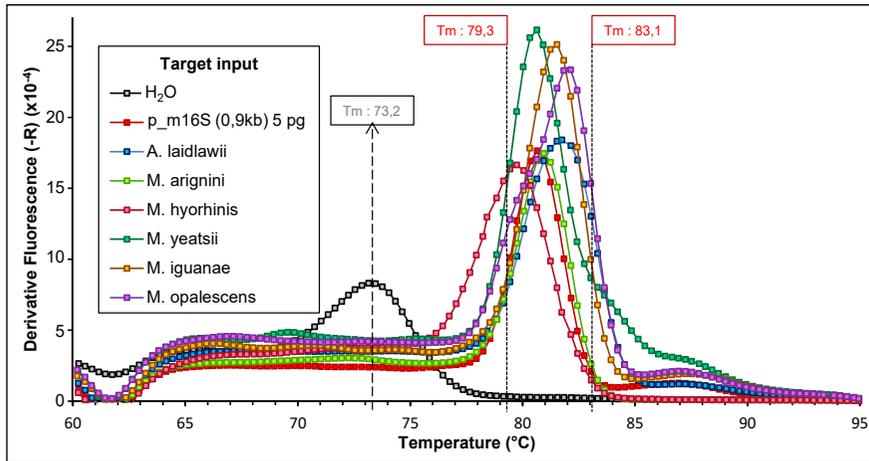


Figure 12 - qPCR mycoplasmes/mollicutes : variation du T_m pour différentes séquences de mycoplasmes détectées.

3.2 Amorces dégénérées

L'utilisation d'amorces dégénérées nécessite de travailler avec un très large excès d'amorces afin que chaque séquence soit suffisamment et équitablement représentée pour permettre l'amplification (Figure 13 et Tableau 3). Cet excès conduit à la formation de dimères visibles dans le contrôle négatif « eau » et dans les échantillons comportant un nombre trop faible de copies de mollicutes.

A = Adénine	} bases purines ou R	B = C, G ou T	
G = Guanine		D = A, G ou T	K = G ou T (cétone ou keto)
C = Cytosine	} bases pyrimidines ou Y	H = A, C ou T	M = A ou C (amine)
T = Thymine		V = A, C ou G	
S = C ou G (3 liaisons hydrogène ou strong)		W = A ou T (2 liaison hydrogène ou weak)	
N = A, G, C ou T (nucléotide)			

Figure 13 - Alphabet dégénéré du code génétique

Tableau 3 - Séquences d'amorces représentées par la dégénérescence du couple Myco16S

Amorce U1 (pool de 6 séquences)	Amorce U8 (pool de 16 séquences)
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT R WTC C A Y CC S CAC - 3'
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGG A CTAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT A ATCC A CC C CCAC - 3'
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGG A CAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT A ATCC A CC C CGAC - 3'
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGG A CGAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT A ATCC A TCC C CCAC - 3'
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGG A TTAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT A ATCC A TCC C GCAC - 3'
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGG A TAAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT A TTC A CC C CCAC - 3'
5' - GTTTGATCCTGGCTCAGG A TGAAC - 3'	5' - GAAAGGAGGT A TTC A CC C CGAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT A TTC A TCC C CCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT A TTC A TCC C GCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G ATCC A CC C CCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G ATCC A CC C CGAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G ATCC A TCC C CCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G ATCC A TCC C GCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G TTC A CC C CCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G TTC A CC C CGAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G TTC A TCC C CCAC - 3'
	5' - GAAAGGAGGT G TTC A TCC C GCAC - 3'

Lorsque le nombre de copies d'ADN de mollicutes est faible, on observe une amplification tardive qui entre en compétition avec la formation des dimères d'amorces bien visibles sur les courbes de fusion des échantillons x, y et z de la Figure 14.

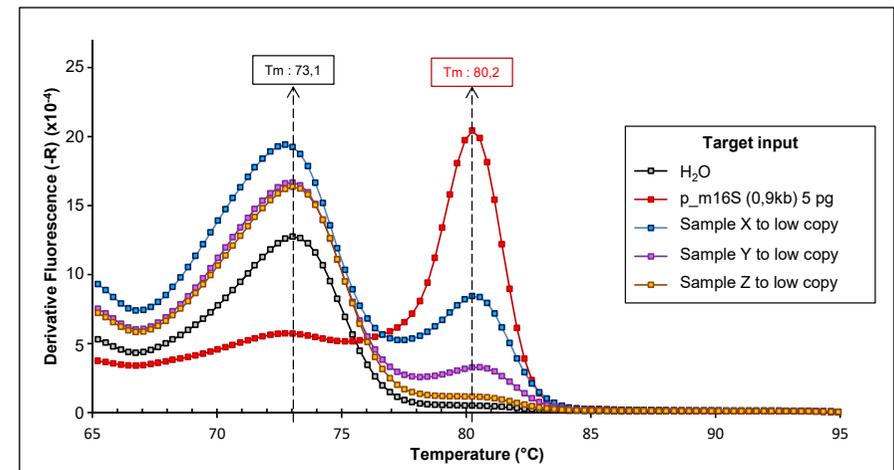


Figure 14 - qPCR mycoplasmes/mollicutes : exemple de courbe de fusion du contrôle négatif (eau) T_m de 73,1°C, du contrôle positif p_m16S(0,9kb) T_m de 80,2°C et d'échantillons à faible copie.

L'analyse de la T_m permet ainsi d'identifier 5 profils de fusion (Figure 15), répartis dans 2 catégories :

- (I) les profils standards comprenant : les positifs (Figure 15 B) et les « non détectables » ou « négatifs » avec une quantité inférieure à 19 copies d'ADN 16S (Tableau 7 C).
- (II) les profils atypiques comportant : les faiblement positifs (avec la présence des dimères d'amorces ou bruit de fond (BF)) (Figure 15 D), les T_m décalées (Figure 15 E) et les pics très larges (Figure 15 F).

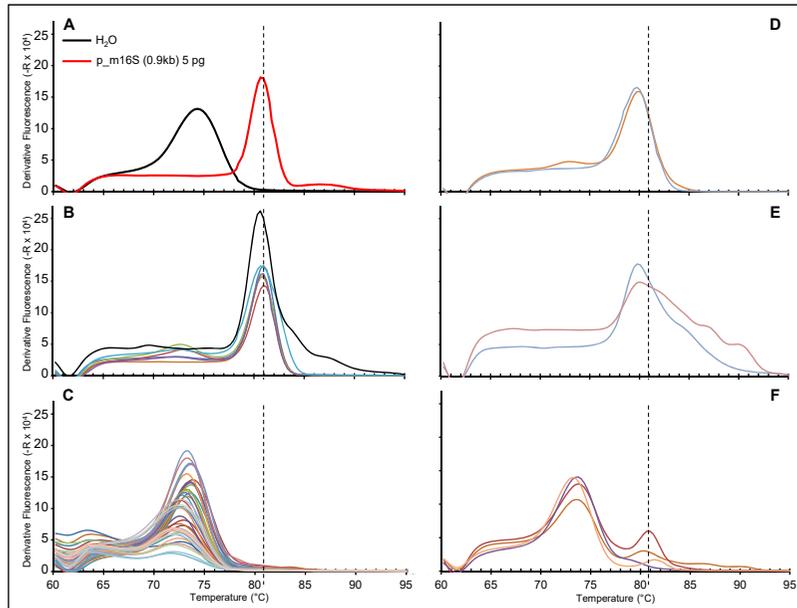


Figure 15 - Exemple montrant les 5 profils de courbes de fusion possibles pour le gène 16S de l'ADN de mycoplasme.

Avantages/Inconvénients

Notre technique qPCR « mycoplasmes/mollicutes » présente deux avantages majeurs et uniques :

- ✓ Une détection universelle de toute la classe des mollicutes (mycoplasmes).
- ✓ La possibilité d'identifier la souche par séquençage direct de l'amplicon collecté après la qPCR et donc de tracer, si nécessaire, la source de contamination.

En outre, si l'échantillon est de bonne qualité, cette approche permet une quantification précise et plus sensible (LOD de 19 copies d'ADN 16S de *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum strain California Kid*, en Figure 7) que toutes les autres techniques, y compris la Coloration Indirecte au Hoechst, l'une des techniques de référence.

Rapide à mettre en œuvre (1 journée), elle est aussi plus fiable que la Coloration Indirecte au Hoechst.

Enfin, c'est une méthode de choix pour des échantillons infectieux P3 et P4 car des procédures validées d'extraction d'ADN permettent de sortir les échantillons en dehors des laboratoires confinés après leur inactivation.

Toutefois, il est fortement recommandé d'avoir une grande rigueur et une bonne maîtrise de la technique qPCR pour obtenir des résultats fiables et reproductibles.

En outre, cette technique est très sensible à la qualité de l'échantillon : la préparation de l'échantillon est une étape primordiale. Il faut veiller au type et à la qualité d'extraction de l'ADN génomique (mesurable grâce au traceur d'ADN « plasmide-GFP » ou « p_GFP ») et à la conservation des acides nucléiques sous forme d'aliquotes à usage unique (éviter les congélations-décongélations).

Cette méthode ne permet pas de faire la distinction entre des mollicutes morts ou vivants. Pour confirmer la viabilité des mollicutes, il sera nécessaire de faire un test fonctionnel de viabilité sur une lignée cellulaire en culture.

D'autres organismes microbiens peuvent être détectés à cause de la conservation des séquences d'ARNr 16S un peu au-delà de la classe des Mollicutes. Dans le domaine de la culture cellulaire, cette particularité est plutôt un avantage car cela peut permettre de détecter incidemment une contamination microbienne de nature autre que mycoplasme. Le séquençage permettra d'identifier le micro-organisme contaminant.

Enfin, il ne faut pas négliger le risque d'une contamination accidentelle par un(e) opérateur(rice) d'un échantillon par de l'ADN de mycoplasme. Une grande rigueur doit donc être respectée dans la manipulation des échantillons comme recommandé pour toute PCR et de penser à vérifier la taille de l'amplicon afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination avec le plasmide p_m16S(0,9 kb) utilisé comme contrôle positif.

Préparation des contrôles nécessaires

Un contrôle Myco_16S positif original construit par sous-clonage de l'ADNr 16S de la souche *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum strain California Kid* et un plasmide ADN « GFP » traceur ADN contrôles ont été utilisés. Ces deux plasmides ont fait l'objet de publications à citer et sont en cours de dépôt chez Addgene (<http://www.addgene.org/>).

- **un plasmide contrôle Myco_16S positif « 0,9 kb » (p_m16S(0,9kb)) [15]**, contenant un insert 16S tronquée en interne de la souche *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum strain California Kid*. L'intérêt de cette référence positive tronquée est sa traçabilité par sa taille réduite après amplification par PCR avec les amorces dégénérées universelles 16S et migration sur gel d'agarose. Cela permet ainsi d'exclure une contamination accidentelle d'un échantillon par cet ADN contrôle positif.
- **un plasmide ADN traceur « p_GFP » [16]** contenant la GFP à partir de laquelle un fragment de 99 bp est spécifiquement amplifié par PCR avec les amorces « GFP ». Ce plasmide sert d'ADN traceur et de source d'amplicon de référence : une quantité identique du p_GFP sera ajoutée à tous les échantillons, avant extraction. La quantité de GFP mesurée par qPCR permet de contrôler les rendements d'extraction d'ADN. La bonne qualité de la qPCR permet d'exclure la présence de contaminants inhibiteurs de PCR dans le produit issu de la purification d'ADN à partir de l'échantillon à analyser.

Méthode A : Extraction d'ADN génomique de mycoplasmes

T₀ = 2h30

Ce test de détection d'une contamination par les mycoplasmes peut être effectué sur : des surnageants de cellules en culture clarifiés (5 min à 200 x g), des échantillons biologiques infectieux (lot de virus), sur des surnageants cellulaire ou infectieux conservés à -80°C.

Il est déconseillé de réaliser l'extraction d'ADN à partir de surnageants cellulaire ou infectieux conservés à 4°C ou à -20°C (dégradation importante des mollicutes) ou de culots cellulaires ou surnageants non clarifiés afin d'éviter un risque accru de contamination de l'ADN extrait par des inhibiteurs de qPCR.

A. Réactifs

- Kit commercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, cat. no. 740952) contenant : les tampons T1 et B3 (Lysis Buffer), BW et B5 (Wash Buffer), BE (Elution Buffer) et PB (Proteinase Buffer) et de la Proteinase K (à conserver à -20°C) ; des colonnes et des tubes collecteur NucleoSpin® Tissue. Ce kit a dans nos mains été le plus performant.
- ADN traceur p_GFP concentré à 10 pg/μL.
- Ethanol Absolu

B. Matériels

- Kit commercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, cat. no. 740952) contenant : les NucleoSpin® Tissue Columns et les NucleoSpin® Tissue Collection Tubes.
- Microtubes 1,5 mL et 0,5 mL coniques *Low Binding* à manipuler avec des gants.
- Microtubes 2 mL à fond rond.
- Centrifugeuse de 11 000 x g ou *ref*
- Bain-marie et/ou plaque chauffante pour les températures de chauffages à 56°C et à 96°C

Attention ! Penser à préchauffer à l'avance les appareils aux températures de 56°C et 96°C.

C. Préparation des échantillons

- 1) Transférer 1 mL d'échantillon à tester dans un microtube de 2 mL à fond rond (instructions dans matériels).

N.B : Il est tout à fait possible d'augmenter ce volume pour augmenter la sensibilité du test.

- 2) Mettre 10 μL d'ADN traceur p_GFP concentré à 10 pg/μL dans chacun des échantillons (soit une quantité finale de 100 pg de p_GFP/échantillon).
- 3) Centrifuger 5 minutes à 8 000 x g ou *ref* précisément.
- 4) Eliminer le SN, en prenant toutes les précautions nécessaire pour éviter d'aspirer le culot qui est invisible.

D. Pré-lyse des échantillons

- 5) Resuspendre le culot cellulaire avec 180 μL de Lysis Buffer T1 par aspiration/refoulement.
- 6) *Dans le cas de l'utilisation de pathogène de niveau 3 ou de niveau 4 : Transférer la suspension cellulaire dans un nouveau tube propre adéquat.*¹
- 7) Ajouter 25 μL de Proteinase K et vortexer vigoureusement.
- 8) Incuber à 56°C jusqu'à ce que la lyse soit complètement obtenue (**au moins 1 heure**) et vortexer toutes les 15 minutes, *si possible*.
- 9) *Dans le cas de l'utilisation de pathogène de niveau 3 ou de niveau 4 : transférer la suspension cellulaire dans un tube propre adéquat.*¹

¹ Attention ces étapes doivent avoir fait l'objet d'une validation par le responsable de biosécurité du laboratoire L3 ou L4.



E. Lyse des échantillons

- 10) Ajouter 200 μL de Lysis Buffer B3 et vortexer vigoureusement.
- 11) Incuber à 96°C pendant 15 minutes.
- 12) Vortexer brièvement.
- 13) *Dans le cas de l'utilisation de pathogène de niveau 3 ou de niveau 4 : transférer la solution dans un tube propre adéquat et la sortie du tube est possible.*¹



F. Conditions de liaison de l'ADN pour la colonne de silice

- 14) Ajouter 210 μL d'Ethanol Absolu dans l'échantillon.
 - 15) Vortexer vigoureusement.
- NB :** Après l'addition d'éthanol, un précipité gélatineux peut se former (en majorité invisible). Il n'aura aucun effet sur la liaison de l'ADN à la colonne. Veuillez alors à bien charger la totalité du précipité sur la colonne à l'étape suivante.



G. Liaison de l'ADN

- 16) Pour chaque échantillon, placer une colonne NucleoSpin® Tissue dans un tube collecteur.
- 17) Transférer la totalité de l'échantillon (environ 500 μL) dans la colonne.
- 18) Centrifuger 1 minute à 11 000 x g ou *ref* précisément.
- 19) Eliminer le SN présent dans le tube.



H. Lavage de la membrane de silice

- 20) Ajouter 500 μL de Wash Buffer BW dans la colonne + tube.
- 21) Centrifuger 1 minute à 11 000 x g ou *ref* précisément.
- 22) Eliminer le SN présent dans le tube.
- 23) Ajouter 600 μL de Wash Buffer B5 dans la colonne + tube.
- 24) Centrifuger 1 minute à 11 000 x g ou *ref* précisément.
- 25) Eliminer le SN présent dans le tube.



I. Séchage de la membrane de silice

- 26) Centrifuger 1 minute à 11 000 x g ou *ref* précisément.
- 27) Eliminer le tube collecteur.
- 28) Placer la colonne dans un nouveau tube 1,5 mL conique (instructions dans matériels).



J. Elution de l'ADN de haute pureté

- 29) Ajouter 50 μL d'Elution Buffer BE et incuber 3 minutes à TA.
- 30) Centrifuger 1 minute à 11 000 x g ou *ref* précisément.
- 31) Ajouter 50 μL de tampon BE et incuber 3 minutes à TA.
- 32) Centrifuger 1 minute à 11 000 x g ou *ref* précisément.
- 33) *Dans le cas de l'utilisation de pathogène de niveau 3 ou de niveau 4 : les tubes peuvent être sortis à la fin de cette étape s'ils n'ont pas été sortis préalablement.*¹



K. Conservation

- 1) Doser les ADN au spectrophotomètre microvolumes (exemple : DeNovix, NanoDrop ou éventuellement au Qubit, si les quantités d'ADN sont très faibles).
- 34) Préparer et annoter 4 microtubes coniques de 0,5 mL (instructions dans matériels).
- 35) Répartir 25 μL d'échantillon par tube et conserver les à -20°C en évitant les congélations – décongélations.



¹ Attention ces étapes doivent avoir fait l'objet d'une validation par le responsable de biosécurité du laboratoire L3 ou L4.



Méthode B : qPCR Mollicutes/mycoplasmes

T0 = 6h50 pour 20 échantillons

A. A partir des extraits d'ADN et des 2 contrôles plasmidiques congelé à -20°C précédemment en méthode A et B. Réactifs

- Kit commercial FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, cat. no. 4913850001).
- Amorces Myco16S synthétisées, purifiées par SDS-PAGE, conservées congelé et concentré à 20 µM, sous forme d'aliquote à usage unique, séparément et à utiliser à 1 µM finale pour l'amorce U1 et à 2 µM finale pour l'amorce U8 :
 - U1 (F) : 5' - GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAAC - 3'
 - U8 (R) : 5' - GAAAGGAGGTRWTCAYCCSCAC - 3'
- Amorces GFP conservées congelé et concentré à 20 µM, sous forme d'aliquote à usage unique, séparément et à utiliser à 0,01 µM finale chacune :
 - F: 5' - ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA - 3'
 - R: 5' - CTCGCCGACACGCTGAACT - 3'
- Eau RNase/DNase free à usage unique et de pH 7/8 (BioMérieux, cat. no. 70640).
- Plasmides contrôles : 0,9 kb et p_GFP concentré à 1 pg/µL.

B. Matériels

- Hotte UV de travail dédiée à la préparation des mélanges réactionnels
- Hotte UV de travail dédiée à la préparation de la plaque
- Vortex de paillasse
- Centrifugeuse de paillasse
- Bloc froid conservé à -20°C
- Jeu de pipettes réservées à la qPCR
- Portoirs
- Pointes à filtres type *Low Binding*
- Microtubes de 1,5 mL coniques type *Low Binding*, à manipuler avec des gants
- Poubelle de déchets biologiques
- Gants
- Plaque MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems, cat. no. 4346906)
- Films transparents MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, cat. no. 4311971)

C. Préparation des Mélanges Réactionnels (Master Mix)

- 2) Dans une hotte UV dédiée à la préparation des mélanges réactionnels, mettre plusieurs paires de gants, un portoir, plusieurs tubes, des pointes, un jeu de pipette, un marqueur et de l'eau.
- 3) Traiter aux UV pendant 10 minutes.
- 4) Réaliser un premier mélange réactionnel pour les amorces « **Myco16S** » par addition des réactifs comme le montre le **Tableau 4**. Vortexer la solution puis centrifuger le tout pour obtenir une solution complète et homogène.

POINT CRITIQUE : Conserver séparément chaque amorce sens (F) et anti-sens (R) de chaque gène à une concentration de 20 µM. Additionner les réactifs selon l'ordre préconisé, en terminant par les amorces. Ouvrir avec précaution les tubes d'amorces **à l'extérieur** de la hotte pour éviter de générer un aérosol contaminant sur l'espace de travail.



Tableau 4 - Composants du Mélange Réactionnel Myco16S de qPCR

Mélange Réactionnel Myco16S	Concentration Finale	Volume par tube réactionnel (µL)
Eau Stérile (pH 7/8)		2
FastStart SYBR Green Master (ROX) 2X	1X	10
Amorces Myco 16S_F ou U ₁ à 20 µM	1 µM	1
Amorces Myco 16S_R ou U ₈ à 20 µM	2 µM	2

- 5) Pour normaliser les résultats, réaliser un second mélange réactionnel avec les amorces « **GFP** » par addition des réactifs comme le montre le **Tableau 5**. Vortexer la solution puis centrifuger le tout pour obtenir une solution complète et homogène. Ce mélange réactionnel GFP permet la normalisation des résultats par un gène de référence, une séquence GFP de 99 bp.

Tableau 5 - Composants du Mélange Réactionnel GFP de qPCR

Mélange réactionnel GFP	Concentration Finale	Volume par tube réactionnel (µL)
Eau Stérile (pH 7/8)		4,6
FastStart SYBR Green Master (ROX) 2X	1X	10
Amorces GFP_F ou 1F à 20 µM	0,2 µM	0,2
Amorces GFP_R ou 99R à 20 µM	0,2 µM	0,2

D. Préparation de la plaque qPCR

- 6) Dans une hotte UV (#2) dédiée strictement pour la préparation de plaques de qPCR, mettre un portoir, une plaque MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction Plate, deux films transparents MicroAmp™ Optical Adhesive Film, des pointes à filtres, plusieurs paires de gants, un jeu de pipettes automatiques et de l'eau stérile.
- 7) Lancer le traitement aux UV pendant 10 minutes.

POINT CRITIQUE : Déstocker les échantillons et les contrôles (p_m16S(0,9kb) et p_GFP à 1 pg/µL) du -20°C et les conserver dans un bloc froid pendant la durée de préparation de la plaque qPCR.

- 8) Commencer par la distribution du mélange réactionnel Myco16S de 15 µL/puits, en duplicata par échantillon et contrôle.

ATTENTION ! Mélanger PUIS centrifuger soigneusement chacune des solutions AVANT le dépôt sur plaque 96 puits pour s'assurer qu'il n'y a pas de bulles et éviter le stockage partiel de solution dans le bouchon.

- 9) Distribuer ensuite le second mélange réactionnel GFP dans les mêmes conditions que pour le premier mélange réactionnel.
- 10) Ajouter 5 µL d'échantillon ou de contrôle dans les puits adéquats en duplicata. Le volume final par puits est alors de 20 µL/puits réactionnel.
- 11) Eliminer les gants et recouvrir la plaque qPCR d'un film adhésif transparent MicroAmp™.

ATTENTION ! Placer le film avec le bout des doigts et sans toucher la partie utilisée pour la lecture de la fluorescence, éviter la formation de bulles/mousses et la formation de replis du film au-dessus des puits utilisés, enfin bien coller la partie de film adhésif entre chaque puits et sur le contour extérieur des rangées de puits. Ne rien inscrire sur le film ou sur la plaque pour ne pas gêner la lecture du signal.

E. Programmation de l'appareil de mesure qPCR

- 12) Centrifuger légèrement la plaque durant quelques secondes pour ramener la totalité des mélanges au fond des puits et la placer dans l'appareil StepOne Plus™ (Applied Biosystems).
- 13) Programmer le thermocycleur suivant le profil thermique ci-dessous :

Tableau 6 - Conditions du programme de la qPCR pour la détection d'ADN mycoplasmique

Nombre de cycle	Etape	Température	Durée	
1 cycle	Activation de l'enzyme	95°C	10 min	
40 cycles	Dénaturation	95°C	15 s	
	Hybridation /	65°C	2 min	Collecte des données
	Elongation			

POINT CRITIQUE : Si le bloc de la machine est du type « rapide » (FAST), il est fortement recommandé d'utiliser un mode standard avec un ralentissement des montées et descentes en température (nouvelle programmation des « rampling » du bloc).

- 14) Dans cette expérience, nous avons optimisé les paramètres de mesure de la courbe de fusion pour la rendre très résolutive en augmentant le nombre de points d'acquisition de la fluorescence : programmer un gradient de température de 65 à 95°C, en mesurant la fluorescence tous les 0,3°C, avec un « ramping » du bloc à 100% entre l'étape de dénaturation (95°C) et l'étape d'hybridation/élongation (65°C). La durée du « run » est d'environ 3 heures.
- 15) Une fois la PCR terminée, ranger la plaque qPCR dans une enveloppe annotée et la conserver à -20°C.

F. Analyse des données qPCR

ATTENTION !

Pour obtenir des résultats fiables et reproductibles, l'analyse des données de qPCR doit être rigoureuse. Le croisement d'un seuil de détection sur les cinétiques d'amplification permet de lire le Cq. Cette valeur permettra de faire les calculs de quantification. Le positionnement de ce seuil doit faire l'objet d'une attention particulière : il doit toujours être choisi par l'utilisateur avec la même démarche et sur la même taille d'écran.

- A - Sur la vue linéaire, le plus bas possible dans la zone exponentielle de la cinétique
- B - Sur la vue log, vérifier que le seuil est bien au-dessus du bruit de fond (Figure 16).

Les étapes ci-dessous, en Figure 16, ont été conçues pour permettre la standardisation des techniques d'analyses.

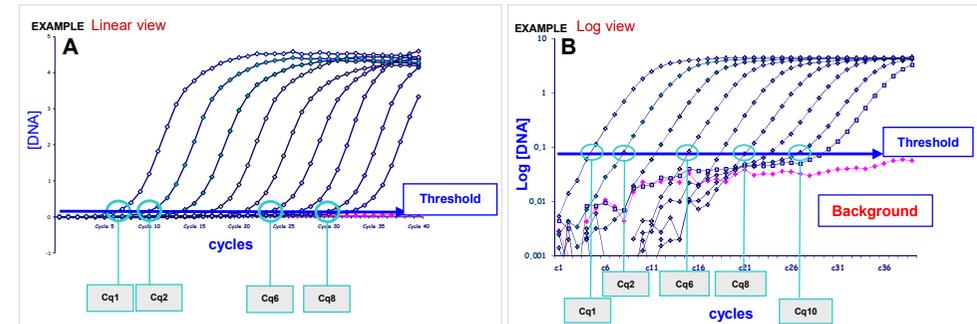


Figure 16 - Procédure de positionnement du seuil de détection.

a) Mélange réactionnel GFP

(1) Courbes de fusion ou « Melting curves »

16) Pour analyser les courbes de fusion des contrôles et des échantillons, utiliser les bonnes pratiques de la technique qPCR.

- a) Comparer les profils et les T_m des échantillons à ceux des contrôles positif et négatif.

Contrôle positif GFP ou p_GFP : T_m de 83,55°C ± 0,16°C.

Contrôle négatif ou non détectable : T_m de 76,39°C ± 0,10°C.

ATTENTION ! Si un échantillon présente le profil d'un contrôle négatif ou non détectable cela signifie que l'échantillon a été perdu au cours de l'extraction. Cet échantillon devra donc faire l'objet d'une nouvelle extraction.

Un exemple est disponible en Figure 17 avec en : (A) les contrôles p_GFP et eau ; et (B) profil positif à la détection du signal de GFP.

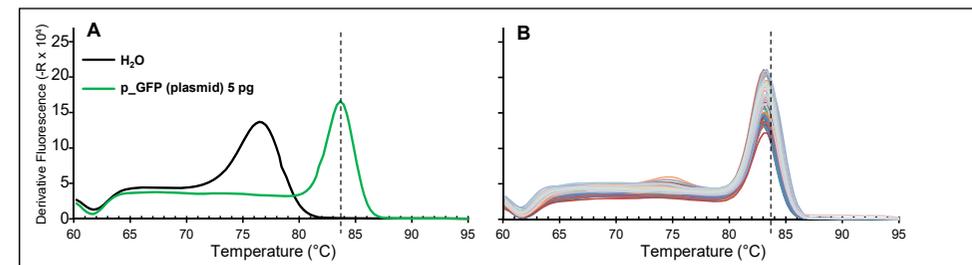


Figure 17 - Profils positif et négatif ou non détectable des courbes de fusion contrôlent pour le gène GFP.

(2) Courbes d'amplification ou « Amplification plot »

17) Examiner les graphiques des courbes d'amplification des contrôles et des échantillons :

- b) Vérifier l'allure des courbes des contrôles et des échantillons.
- c) Vérifier la valeur du Cq du contrôle positif p_GFP. Si cette valeur est trop éloignée de la valeur attendue, il est probable que des erreurs ont été commises dans l'exécution du protocole de qPCR : les résultats ne seront pas valides.

Exemple : nous avons validé un Cq moyen de 17,6 ± 1,4 Cq, dans nos conditions expérimentales (opérateur, machine et kit).

- d) Conclure avec si besoin, l'utilisation du **tableau Anomalies et Solutions** disponible en page **Erreur ! Signet non défini.**

L'efficacité d'amplification du couple d'amorces GFP est : **E = 1,99136 (Figure 6)** et la limite de détection (LOD) pour la quantification de GFP est de 21,7 Cq.

h) Mélange réactionnel Myco16S

(3) Courbes de fusion ou « Melting curves »

18) Examiner les courbes de fusion des contrôles, puis des échantillons :

- e) Comparer les profils et T_m des échantillons par rapport à ceux des contrôles.
- f) Classer les échantillons suivant 5 profils différents, qui sont :

Profil°1 : ADN mollicutes 16S et contrôle 0,9 kb : T_m de 80,93°C ± 0,14°C (**Tableau 7, A et B**).

Profil°2 : Contrôle négatif « Eau » et échantillon avec des mollicutes non détectables : T_m de 74,01°C ± 0,45°C (**Tableau 7, A et C**).

Profil°3 : Courbe de fusion présente un double pic associant celui des dimères d'amorces avec celui d'une trace l'ADN 16S (**Tableau 7, D**).

Profil°4 : T_m décalée par rapport à celle de la référence p_m16S(0,9kb) (**Tableau 7, E**).

Profil°5 : La courbe de fusion présente un double pic associant celui des dimères d'amorces avec un pic large de l'ADN 16S bien visible (**Tableau 7, F**).

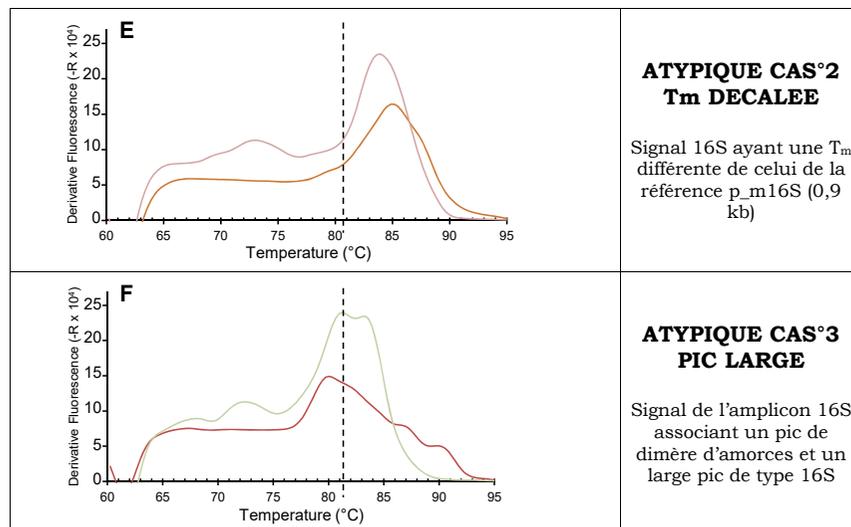
Un exemple est disponible en **Figure 15** avec en **(A)** les contrôles p_m16S(0,9kb) et eau, en **(B)** profil typique d'ADN 16S, en **(C)** profil de l'eau (dimères d'amorces) sans signal d'ADN 16S, en **(D)** profil positif d'ADN 16S ayant une T_m décalée par rapport au contrôle, en **(E)** profil positif présentant un pic plus large que celui de la référence p_m16S(0,9kb) et en **(F)** profil associant un fort pic « bruit de fond » (dimères d'amorces) et un pic d'ADN 16S.

Tableau 7 - Profils des 5 courbes de fusion possible pour la détection du gène 16S de l'ADN de mycoplasme

Courbes de fusion possibles	Profils associés
	<p>CONTROLES</p> <p>Négatif (noir) : Eau (dimère d'amorces)</p> <p>Positif (rouge) : p_m16S(0,9kb) à 5 pg</p>
	<p>POSITIF</p> <p>Détection du signal de l'amplicon du gène de l'ARNr 16S</p>
	<p>NON DETECTABLE</p> <p>Signal du dimère d'amorces</p>
	<p>ATYPIQUE CAS°1 FAIBLEMENT POSITIF</p> <p>Signal majoritaire du dimère d'amorces et un second signal de l'amplicon 16S cible</p>

Tableau 8 – Anomalies de l'analyse de qPCR et solutions

Identification de l'anomalie	Problèmes possibles associés	Vérification
ANOMALIES SUR LES CONTROLES ET LES ECHANTILLONS		
Absence de toutes amplifications	<ul style="list-style-type: none"> *Conditions de stockage du kit qPCR et/ou des amorces non respectées. *Oublie des amorces dans le mix *Oublie de la polymérase *Erreur de programmation du thermocycleur 	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ les amorces sont sous formes d'aliquot à usage unique ⇒ la température de conservation est de -20°C ⇒ la date de péremption des solutions ⇒ la date de création du lot d'aliqots des amorces ⇒ programme thermocycleur ⇒ l'outil Multicomponent (ROX)* sur le logiciel (Applied seulement)
Absence d'amplification du contrôle positif	<ul style="list-style-type: none"> *Conditions de stockage du contrôle non respectées. *Oublie de distribution du contrôle positif 	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ le volume réactionnel ⇒ la température de conservation est de -20°C ⇒ la date de péremption des solutions ⇒ la date de création du lot d'aliqots des amorces
Présence d'amplification dans le contrôle négatif (eau) autre que celui du dimère d'amorces	<ul style="list-style-type: none"> *Erreur de dépôt du Mix/échantillons 	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ contamination de l'eau par de l'ADN mollicutes
T_m du contrôle positif différent	<ul style="list-style-type: none"> *Erreur de préparation du Mix *Problème du niveau de dégradation du matériel génétique du contrôle 	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ la valeur du C_q ⇒ le volume réactionnel ⇒ l'outil Multicomponent (ROX)* sur le logiciel (Applied seulement)



(4) Courbes d'amplification ou « Amplification plot »

19) Examiner les courbes d'amplification des contrôles et des échantillons :

- g) Vérifier l'allure des courbes des contrôles et des échantillons.
- h) Vérifier la valeur du C_q du contrôle de référence p_m16S (0,9 kb). Si cette valeur est trop éloignée de la valeur attendue, il est probable que des erreurs ont été commises dans l'exécution du protocole de qPCR : les résultats ne seront pas valides.

Exemple : nous avons validé un C_q moyen de 18,9 C_q ± 1,6 C_q, dans nos conditions expérimentales (opérateur, machine et kit).

- i) Conclure avec si besoin, l'utilisation du **Tableau Anomalies et Solutions** disponible en page **Erreur ! Signet non défini.**

L'efficacité d'amplification du couple d'amorces Myco16S est : **E = 1,99847 (Figure 7)** et la LOD pour la quantification des échantillons est de 33,58 C_q.

ij) Anomalies et Solutions

Lors de l'analyse des courbes de fusions et d'amplification, la présence d'anomalies peuvent être observées. Pour mener à bien la recherche des sources d'erreurs potentielles, tous les paramètres impliqués dans la mise en œuvre de la réaction de qPCR doivent être contrôlés.

Le **Tableau 8** ci-dessous retrace plusieurs anomalies possibles, avec l'identification probable du problème sous-jacent. **Dans tout les cas, la réaction de qPCR doit être refaite après résolution du problème.**



Variation de la valeur du Cq du contrôle positif	*Erreur de préparation du Mix	⇒ le volume des puits (sur la plaque ou via le Multicomponent (ROX)* sur le logiciel)
	Erreur provenant de la machine	⇒ outils de diagnostic du logiciel (Multicomponent (ROX), le programme du Run, le ramplung du bloc, etc.)
	*Erreur de dépôt du Mix/échantillons	⇒ le lot du kit qPCR ⇒ la machine elle-même ⇒ la température de la pièce où est stocké la machine
	*Problème du niveau de dégradation du matériel génétique du contrôle	⇒ nombre de cycles de congélation / décongélation différent

UNIQUEMENT LES ANOMALIES DES ECHANTILLONS

Absence d'amplification du gène GFP dans les échantillons seulement	*Mauvaise extraction de l'ADN génomique	⇒ la vitesse de centrifugation ⇒ les solutions utilisées et leurs volumes ⇒ les temps d'incubation ⇒ les températures d'incubation
--	---	---

** outil Multicomponent (ROX) : Les appareils d'Applied System disposent d'un outil de diagnostic précieux appelé « Multicomponent » correspondant à l'enregistrement de toutes les fluorescences au cours du temps. Cet outil permet de contrôler par exemple les erreurs de distribution de la plaque.*

N.B. : Les valeurs mentionnées dans ce présent document sont données à **titre indicatif**. Elles correspondent à un protocole et des conditions expérimentales bien précis: même appareil de qPCR, même opérateur et même kit de qPCR.

j) Quantification du taux de contamination par des mycoplasmes

La quantification est composée de 3 étapes de calculs, où il faut déterminer :

- La Quantité Arbitraire d'ADN de GFP (QA_{GFP})
- La Quantité Arbitraire d'ADN de Myco 16S (QA_{Myco 16S})
- La Quantité Relative d'ADNr 16S de mollicutes (QR_{Myco 16S})

Pour calculer la QA, on a besoin de l'efficacité de GFP (E_{GFP}) et de Myco 16S (E_{Myco 16S}) et du nombre de cycles obtenus (Cq).

$$QA = E^{-Cq}$$



Exemple GFP:

$$E_{GFP} = 1,99136 \text{ et } Cq = 20,53 : \\ QA_{GFP} = 1,99136^{-20,53} = \underline{7,219 \times 10^{-7}}$$

Exemple Myco 16S:

$$E_{Myco16S} = 1,83870 \text{ et } Cq = 13,75 : \\ QA_{Myco16S} = 1,83870^{-13,75} = \underline{2,307 \times 10^{-4}}$$

Pour calculer la QR, on calcule le ratio suivant :

$$QR = QA_{Myco16S} / QA_{GFP}$$

Exemple :

Si QA_{GFP} = 7,219 x 10⁻⁷ et QA_{Myco 16S} = 2,307 x 10⁻⁴, alors :
QR = (2,307 x 10⁻⁴) / (7,219 x 10⁻⁷) = **319,57**

Pour calculer le nombre de copies d'ADN correspondant à la QR, on a besoin de la masse moléculaire d'ADNdb génomique (M_{ADNdb génomique}) et du nombre d'Avogadro (N_A).

$$\text{Copies d'ADN} = (QR_{Myco16S} \times N_A) / M_{ADNdb\ génomique}$$

Exemple :

Si QR_{Myco 16S} = 319,57, alors :
QR = (319,57 x 6,02214129 x 10²³) / 9,90 x 10¹⁴
QR = 1,94 x 10¹¹ copies d'ADNr 16S

k) Rendement d'extraction

Avant extraction, chaque échantillon a reçu une quantité identique de GFP, équivalente à celle du contrôle positif p_{GFP}.

Pour calculer le rendement, on calcule un ratio correspondant à la quantité de GFP retrouvée dans l'échantillon après extraction divisée par la quantité du contrôle positif p_{GFP} :

$$\text{Rendement} = (E_{GFP\ échantillon}^{-Cq} / E_{GFP\ contrôle}^{-Cq}) \times 100$$

Exemple :

Si Cq_{p_{GFP}} = 19,48 et Cq_{échantillon} = 20,53, alors :
Rendement = ((1,99136^{-20,53}) / (1,99136^{-19,48})) x 100 = **48,5 % d'ADN GFP récupéré**

G. Cas d'un résultat dit « faiblement positif »

Pour améliorer la sensibilité de détection pour les échantillons ayant obtenus un résultat atypique « faiblement positif », une seconde qPCR est réalisée dans les mêmes conditions avec, cette fois, un « ramping » du bloc abaissé à 10% entre l'étape de dénaturation (95°C) et l'étape d'hybridation/élongation (65°C). La durée du « run » est d'environ 5 heures.



Méthode C : Confirmation des statuts des échantillons

TO = 55 min pour 12 échantillons

A partir des produits qPCR congelés à -20°C comme décrit précédemment pour la méthode C.

A. Réactifs

- Agarose Ultra pure
- Tampon TAE 1X
- Colorant fluorescent de gel : GelRed™
- Eau propre, autoclavée
- Produits qPCR conservés à -20°C
- Tampon de charge : BBPG 6X
- Marqueur de taille : 1Kb™ Plus DNA Ladder (Sigma-Aldrich, cat. no. 10787-018)

B. Matériels

- Centrifugeuse pour microplaque
- Centrifugeuse de paillasse
- Vortex
- Pipettes, Portoirs, Pipetman, Pipet-aid
- Tubes 1,5 mL coniques et pointes à filtres *low binding*
- Tubes 2 mL coniques
- Poubelle de déchets biologiques
- Gants
- Cuve d'électrophorèse (couvercle et cordons)
- Préparateur de gel, peignes et plateaux.
- Scalpel
- Générateur d'électrophorèse
- Table UV avec les équipements de protection aux UV

C. Gel de migration électrophorétique

A partir des profils obtenus dans la **méthode C paragraphe F page 43**, suivre les étapes ci-dessous :

- 20) Réaliser un gel d'Agarose à 1% en tampon TAE 1X et avec le colorant GelRed™.
- 21) Placer le gel muni de son socle dans une cuve d'électrophorèse et ajouter du tampon TAE 1X jusqu'à ce que le gel soit recouvert de quelque millimètre. Retirer la barrette de puits délicatement du gel et éliminer les bulles formées à l'aide d'une pointe de cône de pipette.
- 22) Sur un portoir à tube 1,5 mL conique, mettre 2 tubes vides par échantillons testés avec une marge d'erreur de 2 tubes vides. Annoter les deux séries de tubes de couleurs différentes. Placer le(s) portoir(s) rempli(s) sous une hotte UV, accompagné de paires de gant, de pipettes automatiques et de pointes à filtre.
- 23) Laisser le traitement aux UV pendant 10 minutes.
- 24) Déstocker la plaque qPCR du -20°C et après décongélation, centrifuger légèrement la plaque pendant quelques secondes ou « spin down » afin de recueillir les produits des échantillons et contrôles dans leur totalité.
- 25) Dans la première série de tubes, transférer le milieu réactionnel des duplicatas/échantillons et contrôles issue du mélange Myco16S.
- 26) Mélanger, centrifuger chacun des échantillons/contrôles et le tampon de charge BBPG 6X.
- 27) Mettre 4 µL de tampon de charge 6X avec 20 µL d'échantillons/contrôles dans la seconde série de tubes.
- 28) Mélanger, centrifuger et déposer sur gel d'électrophorèse, un volume de 10 à 12 µL de marqueur de taille 1Kb Plus DNA Ladder dans les puits situés aux extrémités du gel. Puis 20 µL de la seconde série de tubes contenant échantillons/contrôles + BBPG 6X.



- 29) Lancer la migration à 110 V pendant environ 45 min pour optimiser la migration de la bande cible à 1500 bp et avoir le front de migration en limite du bord du gel.
- 30) Observer le gel sous une lampe UV munie d'une caméra et imprimer la photo du gel.

D. Interprétations

a) Résultat Positif

La présence d'une bande plus ou moins intense de 1,5 kb, sise entre les bandes de référence 1000 et 1650 bp, confirme la contamination par un mycoplasme et la préparation pour le séquençage est possible (**profil positif**).

j) Résultat Non Détectable

En cas d'absence de bande, l'échantillon est exempt de contamination détectable par les mycoplasmes ; si et seulement si, le profil de la courbe de fusion était celui du dimère d'amorces (**profil non détectable**).

m) Résultat Atypique

Alternativement, une absence de bande peut traduire une trop faible quantité d'ADN de mycoplasme dans l'échantillon pour permettre de le révéler sur gel de migration, si et seulement si, le profil de la courbe de fusion rentre dans la catégorie des profils atypiques.

Les échantillons sont alors statués comme « résultats atypiques ». Ils doivent alors être testés de nouveau après deux à trois semaines supplémentaires de culture cellulaire .

E. Préparation pour l'identification de la souche de mycoplasme contaminante

- 31) Découper au scalpel sous UV les bandes situées à la hauteur de 1,5 kb et les transférer dans des tubes 2 mL préalablement annotés. Réduire au maximum le temps d'exposition du gel aux UV pour éviter la dégradation de l'ADN (pontage des thymidines en particulier).

PAUSE : Les bandes à 1,5 kb peuvent être conservées à -20°C pendant plusieurs jours ou à 4°C pendant quelques heures, pour l'identification de la ou des souches.

F. Recommandations importantes

Attention !

Un **résultat positif**, indique la présence d'ADN de mycoplasme mais **ne donne aucunement d'indication sur la viabilité** de ces Mollicutes.

C'est pourquoi, il est fortement recommandé **d'effectuer ces tests** de détection de **manière routinière** (une fois par mois par exemple). Ainsi, pour un même échantillon, le suivi qPCR permettra de déterminer si les mollicutes sont vivants (accroissement du nombre de copies au cours du temps) ou morts (le résultats positif dans un premier temps deviendra négatif).

Méthode D : Identification de la souche contaminante

TO = 2H30

A partir des bandes d'ADN de 1,5 kb ou des produits qPCR congelés précédemment en méthode D à -20°C.

A. Réactifs

- **Echantillons à envoyer** : produits qPCR ou bandes d'ADN de 1,5 kb conservés à -20°C.
- Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, cat. no. 740609).
- Amorce Myco16S synthétisées, purifiées par SDS-PAGE et conservées à -20°C :
 - U1 (F) : 5' - GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAAC - 3'
 - U8 (R) : 5' - GAAAGGAGGTRWTCCAYCCSCAC - 3'
- Eau RNase/DNase free à usage unique et de pH 7/8 (BioMérieux, cat. no. 70640).

B. Matériels (avec comme exemple MWG Eurofins génomics comme prestataire de séquençage de type Sanger)

- Centrifugeuse de paillasse
- Vortex de paillasse
- Pipettes, Portoirs, Pipetman, Pipet-aid
- Tubes 1,5 mL coniques et pointes à filtres *low binding*
- Poubelle de déchets biologiques
- Gants
- Enveloppes bulle
- Etiquettes prépayées ou non de chez MWG Eurofins genomics
- Sachet zip de chez MWG Eurofins genomics pour contenir les microtubes (gratuits sur site)
- Sticker contenant l'adresse du destinataire située en Allemagne (gratuits sur site)

C. Préparation des échantillons à séquencer

a) A partir d'une bande d'ADN de 1,5kb sur gel d'agarose

- 32) Réaliser une purification de l'ADN avec le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**. Suivre la procédure « **5.2 - DNA extraction from agarose gels** » avec un volume d'éluat final de 40 µL de la façon suivante :
 - a) Ajouter 20µL de tampon NE préchauffé à 70°C et incubé 1 min à TA.
 - b) Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
 - c) Ajouter 20µL de tampon NE préchauffé à 70°C et incubé 1 min à TA.
 - d) Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
- 33) Doser les ADN purifiés au spectrophotomètre microvolumes (exemple : DeNovix, NanoDrop ou éventuellement au Qubit, si les quantités d'ADN sont très faibles).
- 34) Pour chaque échantillon à séquencer, préparer **deux tubes** 1,5 mL coniques avec une concentration finale de 10 ng/µL pour un volume de 15 µL. Conserver le reste de solution d'ADN purifié à -20°C.
- 35) A l'aide d'étiquettes MWG Eurofins, identifier chaque échantillon (exemple : 0,9 kb).



Photo 14 - Etiquettes prépayées



Photo 15 - Etiquettes paiement différé

n) A partir de produit qPCR

- 36) Réaliser une purification de l'ADN avec le kit **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up**. Suivre la procédure « **5.1 - PCR Clean-up** » avec un volume d'éluat final de 40 µL de la façon suivante :
 - e) Ajouter 20µL de tampon NE préchauffé à 70°C et incubé 1 min à TA.
 - f) Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
 - g) Ajouter 20µL de tampon NE préchauffé à 70°C et incubé 1 min à TA.
 - h) Centrifuger 1 min à 11 000 x g.
- 37) Doser les ADN purifiés au spectrophotomètre microvolumes (exemple : DeNovix, NanoDrop ou éventuellement au Qubit, si les quantités d'ADN sont très faibles).
- 38) **Pour chaque échantillon** à séquencer, préparer **deux tubes** 1,5 mL coniques avec une concentration finale de 10 ng/µL pour un volume de 15 µL. Conserver le reste de solution d'ADN purifié à -20°C.
- 39) A l'aide d'étiquettes MWG Eurofins (**Photo 14** ou **Photo 15**), identifier chaque échantillon.

D. Préparation des amorces dégénérées à envoyer

Plusieurs solutions sont possibles pour l'envoi du couple d'amorces dégénérées. Cependant, pour un premier séquençage, l'envoi peut être réalisé de façon « **Standard** ». Si les résultats obtenus à la suite de ce premier séquençage ne sont pas satisfaisants, suivre alors les conditions pour l'amorce U1 et pour l'amorce U8.

a) Standard

- 40) Réaliser dans des tubes coniques 1,5 mL, les concentrations suivantes pour chaque amorce (U1 et U8) qui seront utilisées pour le séquençage.

Primer Concentration and Volume

- Exactly 10 pmol/µl primer concentration is required per sequencing reaction
- Each primer must have a total volume of 15 µl (double distilled water or 5mM Tris-HCl); 5 µl of primer volume is required for every additional sequencing reaction

Figure 18 - Condition d'envois des amorces pour le séquençage

o) Concentrations adaptées aux amorces dégénérées

(1) Amorce U1

L'amorce U1 possède 2 bases dégénérées **Y** et **D** (**Figure 13**), localisées à l'extrémité 3', soit $P = 2 \times 3 = 6$ **séquences différentes possibles**. La concentration finale nécessaire pour le séquençage de l'échantillon est donc $C_{U1} = 6 \times 10 \text{ pmol}/\mu\text{L} = 60 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ pour un volume final de **15 µL**.

Pour chaque **échantillon supplémentaire**, ajouter **5 µL** de volume d'amorce.

Exemple : Séquencage de 3 échantillons

$$V_{\text{amorce U1}} = 15 \times (\text{nb échantillon} - 1)$$

$$V_{\text{amorce U1}} = 15 \times (3 - 1)$$

$$V_{\text{amorce U1}} = 30 \mu\text{L à } 60 \text{ pmol}/\mu\text{L finale}$$

(2) Amorce U8

L'amorce U8 possède 4 bases dégénérées **R, W, Y** et **S** (Figure 13), réparties sur l'ensemble de la séquence, soit $P = 2 \times 2 \times 2 \times 2 = 16$ **séquences différentes possibles**. La concentration final nécessaire pour le séquencage de l'échantillon est donc $C_{U8} = 16 \times 10 \text{ pmol}/\mu\text{L} = 160 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ pour un volume final de **15 μL** .

Pour chaque **échantillon supplémentaire**, ajouter **5 μL** de volume d'amorce.

Exemple : Séquencage de 10 échantillons

$$V_{\text{amorce U8}} = 15 \times (\text{nb échantillon} - 1)$$

$$V_{\text{amorce U8}} = 15 \times (10 - 1)$$

$$V_{\text{amorce U8}} = 210 \mu\text{L à } 160 \text{ pmol}/\mu\text{L finale}$$

(3) Bon de commande

Après l'étape d'enregistrement des échantillons associé aux amorces U1/U8, au moment de remplir le bon de commande, ajouter dans l'encadré « Production comment » le message suivant :

Attention!

Primers primer forward (U1) and primer reverse (U8) are primers with WOBBLES
primer forward (U1) : 5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAAC-3'
primer reverse (U8) : 5'-GAAAGGAGGTRWTCACCCAC-3'

E. Commander et Envoyer : exemple d'un laboratoire à Lyon

L'enlèvement de toutes enveloppes pour le séquencage est effectué chaque jour à 15H30.

41) Formuler sa demande via le site internet

- Aller sur le site de MWG Eurofins : <http://www.eurofinsgenomics.eu>
- Entrer vos codes dans **Login**.



Photo 16 - Ouverture du compte MWG Eurofins genomics

- Passer la souris sur l'onglet **DNA Sequencing**, puis sur **Single Read Services** et cliquer sur **Value Read**.



Photo 17 - Etapes d'ouverture de la commande de demande de séquencage

- Remplir chacun des champs pour chaque tube à séquencer (2 tubes par échantillon), suivre sur la **Photo 18** :
 - ✓ Les **3 derniers** chiffres en gras présents sur l'étiquette (*1)
 - ✓ Le nom de l'échantillon (*2)
 - ✓ La nature de l'échantillon (*3)
 - ✓ Pour envoyer les amorces dégénérées U1 et U8, aller voir dans la colonne présente sur la gauche, remplir les champs dans le paragraphe **Send a primer** (*4) et cliquer sur **Add to Primer list**.
 - ✓ Et enfin choisir l'amorce U1 parmi la liste d'amorces proposées (*5).
 - ✓ Refaire la procédure et choisir à l'étape (*5), l'amorce U8 (exemple pour 0,9 kb : tube 059 avec U1 et tube 060 avec U8).

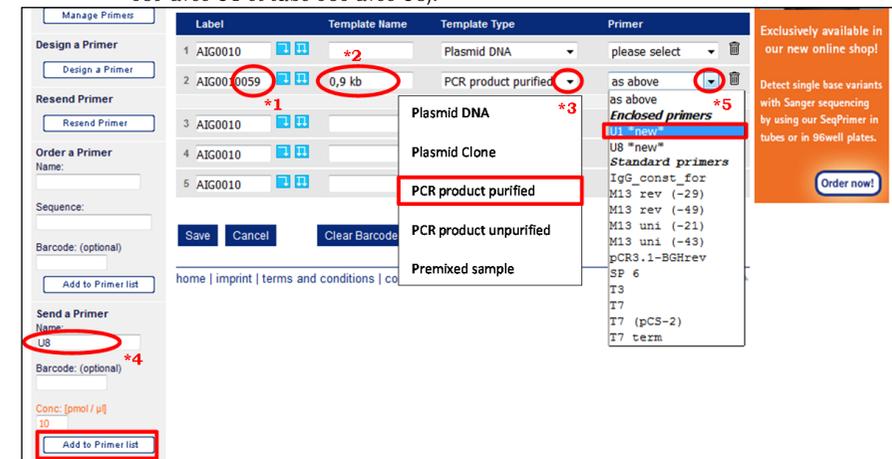


Photo 18 - Etapes pour compléter la commande de séquencage

- Cliquer sur **Save** pour enregistrer la commande, puis aller dans **Order now**. Mettre un nom pour cette commande de séquencage en face de **Your Order ID** sous le format jj-mm-aaaa/Initiales (exemple : 11-07-2014/AJ).
- Cliquer sur **Print View** en 3 exemplaires :
 - un pour l'insérer dans l'enveloppe bulle avec les échantillons
 - un pour le service gestion du laboratoire
 - un pour le laboratoire

42) Mettre les tubes dans un sachet zip de MWG eurofins.

- 43) Insérer le sachet zip rempli et un exemplaire de bon de commande dans une enveloppe à bulle bien fermée.
- 44) Coller le sticker contenant l'adresse du destinataire sur l'enveloppe.
- 45) Déposer l'enveloppe au point de collecte et signaler que c'est pour MWG Eurofins.

F. Analyses des résultats et identification de la souche de mollicute

- 46) Attendre le mail de confirmation, attestant la disponibilité des résultats sur le site (généralement sous les 2 à 3 jours ouvrés).
- 47) Ouvrir son compte MWG Eurofins genomics et aller dans **My Orders**. Ouvrir le dossier en cliquant sur la loupe dans **Track/Download** et télécharger le fichier **zip archive with all files**.

a) Délimitation de la séquence lisible sans erreur

- 48) Ouvrir les 2 fichiers PDF de l'échantillon : un fichier par amorce (éventuellement les imprimer).
- 49) Délimiter la meilleure zone de lecture possible pour les différentes séquences (flèches rouges « Début » et « Fin », **Photo 19**).
- 50) Ouvrir le fichier **SEQ** de l'échantillon séquençé par U1 et U8 (exemple 0,9kb_U1) avec le logiciel ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ap/>) ou MEGA (<http://www.megasoftware.net/>) ou autre logiciel équivalent. Eliminer les bases qui se situent en dehors de la zone de lecture précédemment délimitée (exemple **Photo 19** : éliminer les bases de 406 jusqu'à la fin de la séquence et les 18 bases du début de la séquence, soit une séquence finale de 387 bases). Enregistrer ce nouveau fichier sous l'appellation : **Nom échantillon amorce analysé**. Alternativement, on peut se fier aux fichiers **CLIPPED** qui sont les fichiers **SEQ** dont les extrémités jugées incertaines ont été éliminées par le service de séquençage, au risque de perdre certaines informations en particulier en cas de séquences multiples dues à une contamination double.
- 51) Si présence de superposition de pics colorés, annoter sur le fichier PDF en version papier le(s) autre(s) possibilité(s) en dessous des pics concernés (exemple en **Photo 19** : encadré rouge). Puis, ouvrir alors le nouveau fichier **Nom échantillon amorce analysé** sur le logiciel ApE et remplacer les bases par les nouvelles possibilités en lettre minuscule. Enregistrer alors cette nouvelle séquence sous : **Nom échantillon amorce analysé complémentaire**.

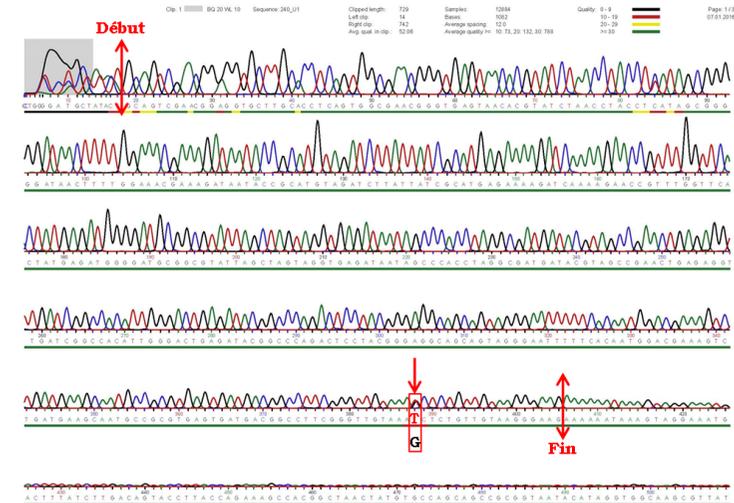


Photo 19 - Analyse du séquençage et corrections d'erreurs de lecture.

p) NCBI : Blastn

- 52) Ouvrir le site du NCBI National Center for Biotechnology Information : www.ncbi.nlm.nih.gov.
- 53) Ouvrir parallèlement, les séquences **Nom échantillon amorce analysé** et **Nom échantillon amorce analysé complémentaire**.
- 54) Ouvrir le programme de **nucléotide blast** ou **blastn**.
- 55) Pour lancer une recherche de séquence nucléotidique dans la base de données des nucléotides (**Photo 20**), insérer dans l'encadré **Enter Query Sequence** la séquence **Nom échantillon amorce analysé** (**Photo 20** : étape 1). Puis, sélectionner dans l'onglet **Choose Search Set** la collection de nucléotides **nr/nt** (**Photo 20** : étape 2). Dans l'onglet **Program Selection**, choisir l'algorithme **blastn** ou **Somewhat similar sequences** (**Photo 20** : étape 3). Et enfin, cocher l'option **Show results in a new window** (**Photo 20** : étape 4). Lancer la recherche en cliquant sur **BLAST** (**Photo 20** : étape 5). **Attention !** Laisser les paramètres de l'algorithme par défaut.
- 56) Refaire cette étape pour le fichier **Nom échantillon amorce analysé complémentaire** de la même amorce et les deux fichiers de la seconde amorce.
- 57) Comparer les résultats des blastn obtenus pour les 4 séquences et déduire l'identité de la souche de mollicute/mycoplasme détectée (**Photo 21**).

NB : Le séquençage depuis les 2 extrémités 5' et 3' avec les amorces sens et anti-sens se chevauchent sur la fin, si les séquences sont de bonne qualité, on obtient ainsi l'intégralité de la séquence du 16S de la souche de mycoplasme contaminante dans l'intervalle des deux amorces. Dans ce cas, le blast peut être effectué avec la séquence consensus obtenue. De nouvelles espèces de mollicutes contaminantes peuvent être fortuitement découvertes. Par exemple, le CRB CelluloNet a pu mettre en évidence pour la première fois une contamination par un mycoplasme jamais encore répertorié comme contaminant de culture cellulaire. Potentiellement, de nouvelles espèces de mollicutes peuvent être aussi identifiées.

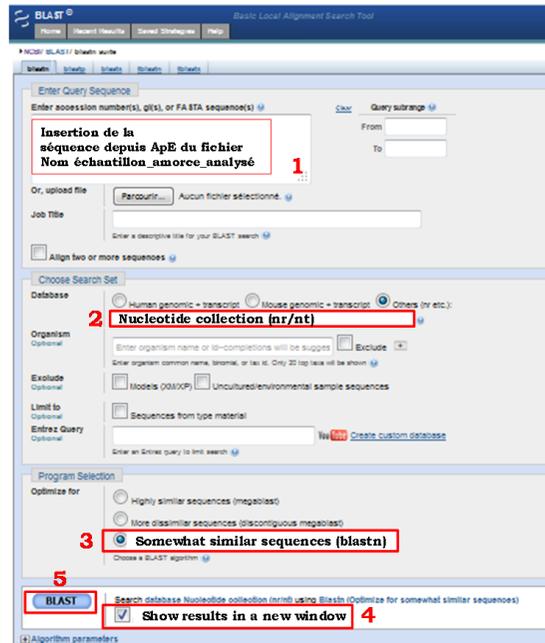


Photo 20 - Conditions pour lancer un blastn : recherche de séquences nucléotidique des mollicutes.

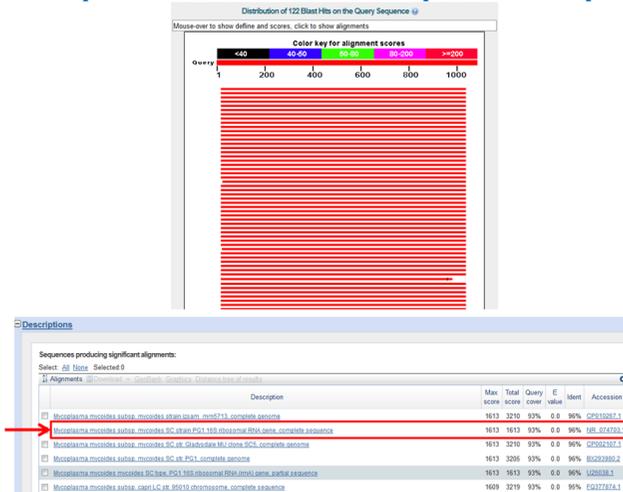


Photo 21 - Exemple de résultat d'une souche la plus rapprochée de notre séquence inconnue.

ELIMINATION DES CONTAMINATIONS

L'origine des contaminations par les mycoplasmes provient principalement de l'utilisation de réactifs dérivés de produits animaux utilisés pour constituer les milieux de culture. Chaque espèce animale héberge potentiellement une/des espèce(s) de mycoplasme qui lui sont propres, comme *Mycoplasma iquanae* qui a comme hôte naturel l'Iguane.

Les principales sources de contaminations par des mollicutes ont pu être identifiées notamment : la flore humaine, les lignées cellulaires déjà infectées par des mollicutes, les milieux et réactifs et la formation d'aérosols [17].

L'utilisation de lignées cellulaires, virus et autres matériels biologiques impliquent de recourir à une (minimum) voire deux (rigueur du contrôle qualité) technique de détection des contaminations par les mycoplasmes, réalisées de façon « routinière », c'est-à-dire : la semaine de la décongélation (lignée cellulaire, virus, etc.), le jour de la congélation, régulièrement pendant la culture et en cas de doute [18].

En cas de contamination, il est préférable d'éliminer la culture au profit d'un lot alternatif « mycoplasma-free » à l'aide d'un nouveau milieu de culture « mycoplasma-free ». Il est recommandé de soigner une lignée cellulaire et/ou un stock viral seulement, si elle/il est considérée comme « unique ».

Plusieurs études montrent l'efficacité de 4 antibiotiques contre les mollicutes dans la médecine vétérinaire/humaine et dans les technologies de culture cellulaire : les tétracyclines, les pleuromutins, les macrolides et les fluoroquinolones [19].

Ainsi, une large gamme de traitements divers, issus de produits commerciaux efficaces sont disponibles :

- Ciprobay ou cyprofloxacine (société Bayer)
- MRA (société MP Biomedicals)
- MycoKill AB (société PAA Laboratories)
- Plasmocin™ (société InvivoGen)
- BM Cycline (société Roche)
- MycoZap™ (société Lonza)

Dans le but de diminuer de manière significative les sources de contaminations par les mycoplasmes, il est important de :

- ✓ Répartir son espace de travail en pièce « propre » et pièce de « quarantaine ».
- ✓ Utiliser les BPL au sein du laboratoire.
- ✓ Travailler sous une hotte à flux laminaire (PSM).
- ✓ Nettoyer son espace de travail à l'alcool 70%, avant et après utilisation.
- ✓ Acheter des milieux et réactifs auprès de fournisseurs qui garantissent explicitement la qualité microbiologique de leurs produits.
- ✓ Cultiver chaque lignée cellulaire avec une bouteille de milieu complet qui lui est réservée.
- ✓ Mettre dans une pièce de quarantaine, toute lignée cellulaire dont le statut « mollicutes » est inconnue.
- ✓ Eviter de créer des aérosols (gouttelettes formées par le pipetage, décantation, centrifugation, sonication).
- ✓ Éliminer toutes lignées cellulaires contaminées par des mycoplasmes. Si la lignée est « précieuse », réaliser un traitement antibiotique efficace, sur une courte durée.
- ✓ Réaliser un test de détection des contaminations par les mycoplasmes de façon routinière.

TABLE DES FICHES MEMOS

Fiche N°1 :Choix des Techniques adaptées selon la nature des d'échantillons...	62
Fiche N°2 :MycoAlert™.....	63
Fiche N°3 :PlasmoTest™ (L2).....	64
Fiche N°4 :PlasmoTest™ (L3 et L4).....	65
Fiche N°5 :Coloration Indirecte au Hoechst.....	66
Fiche N°6 :PCR Quantitative : étapes.....	67
Fiche N°7 :Amplification des contrôles plasmidiques.....	68
Fiche N°8 :qPCR : Extraction d'ADN génomique.....	72
Fiche N°9 :qPCR GFP & 16S mycoplasmes.....	73
Fiche N°10 :qPCR : Analyse courbes de fusion.....	74
Fiche N°11 :Arbre de Décision dans l'Analyse qPCR.....	75
Fiche N°12 :qPCR GFP & 16S mycoplasmes : Echantillon faiblement positif.....	76
Fiche N°13 :Purification des produits qPCR.....	77

Fiche Mémo° 1

CHOIX DES TECHNIQUES ADAPTEES SELON LA NATURE DES D'ECHANTILLONS

MycoAlert

- Surnageant de culture cellulaire clarifié par centrifugation (200 x g, 5 min)
- Surnageant de culture de cellules infectées
- Solution virale, stock virus : BSL2, BSL3 et BSL4***
- Echantillons stérils frais ou congelés à -80°C
- *** **Test à réaliser dans l'enceinte confinée!**

PlasmoTest

- Surnageant de culture cellulaire
- Surnageant de culture cellulaire infectée
- Solution virale, stock virus : BSL2, BSL3 et BSL4***
- Echantillons stérils frais ou congelés à -80°C
- *** **Etape de chauffage à 100°C à réaliser dans l'enceinte confinée!**

Hoechst

- Surnageant de culture cellulaire
- Surnageant de culture cellulaire infectée
- Solution virale, stock virus : BSL2
- Echantillons stérils frais ou congelés à -80°C

qPCR

- Surnageant de culture cellulaire
- Surnageant de culture cellulaire infectée
- Solution virale, stock virus : BSL2, BSL3 et BSL4***
- Echantillons stérils frais ou congelés à -80°C
- *** **Extraction de l'ADN à réaliser dans l'enceinte confinée!**

Echantillons à éviter

- Culot cellulaire
- Pour le tester, réaliser une centrifugation légère 5 min à 200 x g
=> surnageant culture cellulaire clarifié

Fiche Mémo°2

MYCOALERT™

Ajouter 90 µL **Surnageant** + 90 µL de **Réactif**

Laisser 5 min à TA

Mesure : Valeur A

Ajouter 90 µL de **Substrat**

Laisser 10 min à TA

Mesure : Valeur B

Rapport : Valeur B / Valeur A

✓ rapport < 0,9 : pas de contamination

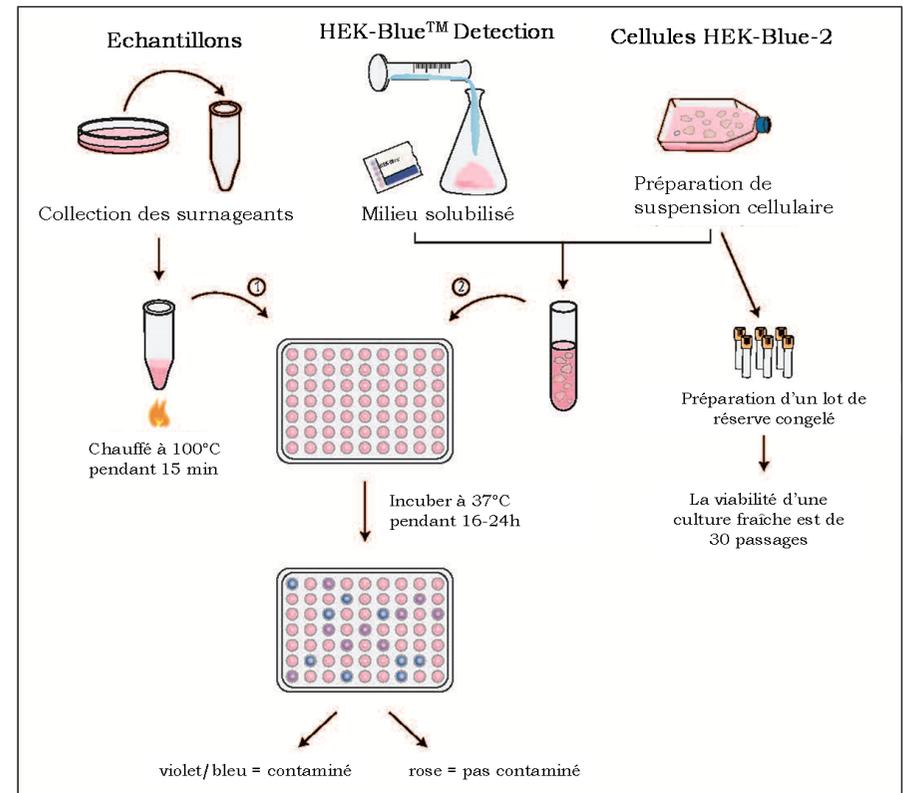
✗ rapport > 1,2 : contamination

? 0,9 < rapport < 1,2 refaire le test après 24h de culture cellulaire supplémentaire

Le volume est remplacé par 50 µL lors d'une utilisation en microplaque.

Fiche Mémo°3

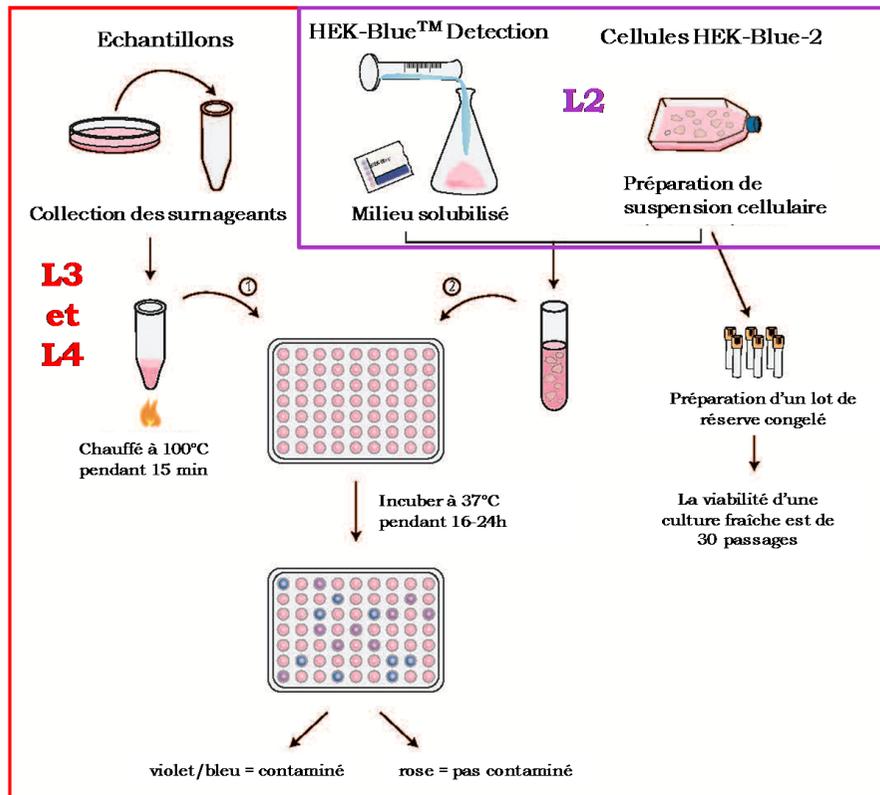
PLASMOTEST™ (L2)



- 1 - Récupérer 500 µL de surnageant de culture .
- 2 - Chauffer les échantillons à 100°C pendant 15 min.
- 3 - Préparer 50 mL de milieu HEK-Blue™ Detection. Filtrer avec utilisation.
- 4 - Ajouter 50 µL de chaque échantillon chauffé dans une plaque 96 puits fond plat.
- 5 - Ajouter 50 µL de chacun des contrôles (+ et -) dans la plaque 96 puits fond plat.
- 6 - Préparer une suspension cellulaire de HEK-Blue-2 dans le milieu HEK-Blue™ Detection.
- 7 - Ajouter 200 µL (environ 50 000 cellules) de suspension cellulaire dans chaque échantillons/ contrôles.
- 8 - Incuber la plaque avec couvercle à 37°C avec 5% de CO₂ (16-24 h).
- 9 - Détecter la présence de mycoplasme à l'œil nu ou via un spectrophotomètre à 620-655 nm.

Fiche Mémo°4

PLASMOTEST™ (L3 ET L4)

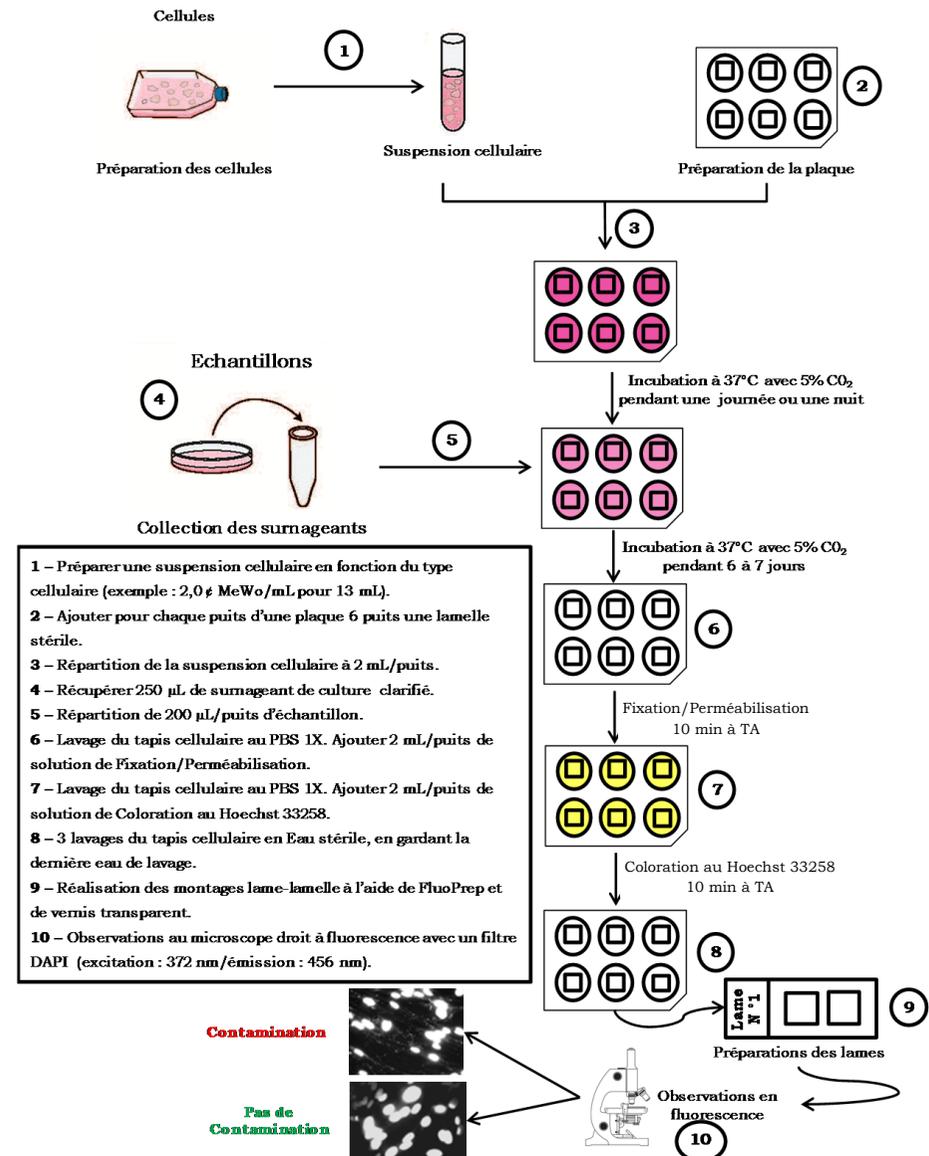


- 1 - Préparer 50 mL de milieu HEK-Blue™ Detection. Filtrer avec utilisation.
- 2 - Préparer une suspension cellulaire de HEK-Blue-2 dans le milieu HEK-Blue™ Detection.
- 3 - Récupérer 500 µL de surnageant de culture.
- 4 - Chauffer les échantillons à 100°C pendant 15 min.
- 5 - Ajouter 50 µL de chaque échantillon chauffé dans une plaque 96 puits fond plat.
- 6 - Ajouter 50 µL de chacun des contrôles (+ et -) dans la plaque 96 puits fond plat.
- 7 - Ajouter 200 µL (environ 50 000 cellules) de suspension cellulaire dans chaque échantillons/contrôles.
- 8 - Incuber la plaque avec couvercle à 37°C avec 5% de CO₂ (16-24 h).
- 9 - Détecter la présence de mycoplasme à l'œil nu ou via un spectrophotomètre à 620-655 nm.

www.invivogen.com

Fiche Mémo°5

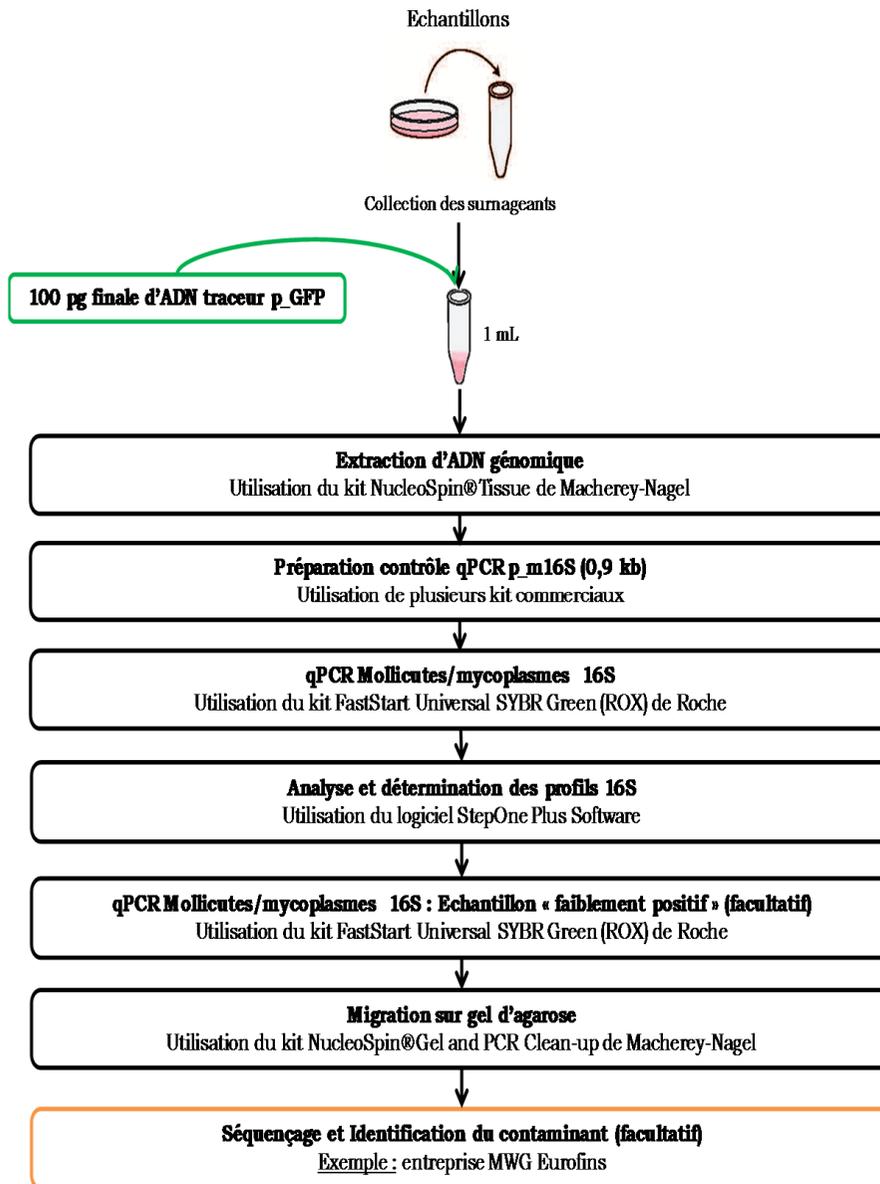
COLORATION INDIRECTE AU HOECHST



- 1 - Préparer une suspension cellulaire en fonction du type cellulaire (exemple : 2,0 x 10⁶ MeWo/mL pour 13 mL).
- 2 - Ajouter pour chaque puits d'une plaque 6 puits une lamelle stérile.
- 3 - Répartition de la suspension cellulaire à 2 mL/puits.
- 4 - Récupérer 250 µL de surnageant de culture clarifié.
- 5 - Répartition de 200 µL/puits d'échantillon.
- 6 - Lavage du tapis cellulaire au PBS 1X. Ajouter 2 mL/puits de solution de fixation/Perméabilisation.
- 7 - Lavage du tapis cellulaire au PBS 1X. Ajouter 2 mL/puits de solution de Coloration au Hoechst 33258.
- 8 - 3 lavages du tapis cellulaire en Eau stérile, en gardant la dernière eau de lavage.
- 9 - Réalisation des montages lame-lamelle à l'aide de FluorPrep et de vernis transparent.
- 10 - Observations au microscope droit à fluorescence avec un filtre DAPI (excitation : 372 nm/émission : 456 nm).

Fiche Mémo°6

PCR QUANTITATIVE : ETAPES



Fiche Mémo°7

AMPLIFICATION DES PLASMIDES CONTROLES p_GFP & p_m16S(9,5kb)

TO = 8 jours

Pour tous tests, des contrôles sont nécessaires à la bonne mise en œuvre de la technique et à la conformité de l'obtention des résultats.

A. Réactifs

- Plasmides : p_m16s (1,5kb) et p_m16S(0,9kb)
- **Enzyme de restrictions :**
 - Pvull avec tampon du fournisseur 10X,
- **Kit commercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, cat. no. 740588)** contenant : les tampons A1, A2 et A3 (Lysis Buffer), A4 (Wash Buffer) et AE (Elution Buffer) des colonnes et des tubes collecteur NucleoSpin® Plasmid.
- **Kit commercial NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, cat. no. 740410)** contenant : les tampons RES (Resuspension Buffer), LYS (Lysis Buffer), EQU (Equilibration Buffer), NEU (Neutralisation Buffer), WASH (Wash Buffer) et ELU (Elution Buffer) : des colonnes, des filtres et des anneaux blancs NucleoBond® Xtra Midi.
- **Kit commercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, cat. no. 740609)** contenant : les tampons NTI (Binding Buffer), NT3 (Wash Buffer) et NE (Elution Buffer) des colonnes et des tubes collecteur NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up.
- Bactéries TOP10 (*Escherichia Coli*) compétentes
- Carbenicilline
- Milieu LB 10X liquide
- Isopropanol
- Agarose Ultra pure
- Tampon TAE 1X
- Colorant fluorescent de gel : GelRed™
- Eau propre, autoclavée
- Tampon de charge : BBPG 6X
- Marqueur de taille : 1Kb™ Plus DNA Ladder (Sigma-Aldrich, cat. no. 10787-018)
- Eau Versol stérile
- Glace

B. Matériels

- **Kit commercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, cat. no. 740588)** contenant : les NucleoSpin® Plasmid Columns et les NucleoSpin® Plasmid Collection Tubes.
- **Kit commercial NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, cat. no. 740410)** contenant : NucleoBond® Xtra Midi Columns, les NucleoBond® Xtra Midi Columns Filters et les anneaux blancs NucleoBond® Xtra Midi.
- Microtubes 2 mL à fond rond et 1,5 mL conique
- Microtubes PCR de 0,5 mL coniques
- Tubes cristals
- Flacon 50 mL
- Pointes à filtres, pipettes sérologiques
- Jeu de pipettes automatiques, pipet-aid
- Incubateur avec ou sans CO₂ à 37°C
- Incubateur sans CO₂ à 15°C
- Incubateur avec agitation à 190 x rpm à 37°C

- Thermocycleur de PCR
- Boîte en polystyrène ou plastique pouvant contenir de la glace
- Bain-marie et/ou plaque chauffante pour la température de chauffage à 42°C
- Centrifugeuse de paillasse, centrifugeuse pour falcon 50 mL à 9 000 x rpm et une centrifugeuse pour microtubes à 11 000 x g ou rcf.
- Vortexe de paillasse
- Portoirs

Attention ! Penser à préchauffer à l'avance les appareils aux températures indiquées ci-dessus.

C. Amplification des plasmides p_GFP et p_m16S(0,9kb) (respectivement ADN traceur et contrôle positif de la qPCR)

a) Transformation des bactéries compétentes

(1) Contact du plasmide (p_GFP ou p_m16S (0,9 kb)) avec les bactéries compétentes

- 1) Dans un tube cristal nommé « **Bactéries Transformées** », mettre 5 µL de solution d'ADN de plasmide à amplifier avec 50 µL de bactéries TOP10 (*Escherichia Coli*) compétentes.
- 2) Dans un tube cristal nommé « **Bactéries seules** » ou « **Témoin bactéries** », mettre 50 µL de bactéries TOP10 (*Escherichia Coli*) compétentes.
- 3) Mélanger doucement avec la pointe d'un cône de pipette.

(2) Choc Thermique

- 4) Mettre les tubes cristaux dans de la glace (4°C) pendant 30 minutes.
- 5) Placer les tubes rapidement pendant précisément 40 secondes à 42°C (bain-marie).
- 6) Replacer les tubes pendant 2 minutes dans la glace (4°C).

(3) Culture des bactéries transformées

- 7) Ajouter 200 µL de milieu SOC dans chacun des tubes « **Bactéries Transformées** » et « **Bactéries seules** ».
- 8) Ouvrir légèrement le bouchon plastique de chacun des tubes afin de laisser pénétrer l'oxygène nécessaire pour le développement des bactéries.
- 9) Incuber sous agitation à 190 x rpm pendant 1 heure à 37°C.
NB : Si nécessaire, il est possible d'incuber les cultures d'expressions entre 45 minutes à 1h30.

(4) Clonage par étalement sur boîte de Pétri

- 10) Préparer des boîtes de Pétri contenant du milieu LB concentré à 1X avec de l'Agarose et de la Carbenicilline diluée au 1/1000^{ème}.
- 11) Homogénéiser chacune des cultures bactériennes par cycle d'aspiration et de refoulement doux.
- 12) Étaler la totalité des cultures d'expressions sur des boîtes de Pétri préalablement préparées, à l'aide d'un rateau.
- 13) Incuber les boîtes une nuit à 37°C puis conserver les boîtes à 4°C.

b) Amplification de clones transformés en mini-culture et purification du plasmide par « Miniprep »

(1) Préparation des cultures « Miniprep »

- 14) Observer les boîtes de cultures.
- 15) Préparer 40 mL de milieu LB concentré à 1X liquide et supplémenté avec de la Carbenicilline au 1/1000^{ème}. Pour cela, dans une bouteille en verre avec bouchon à viser stérile, mettre

- dans 36 mL d'Eau Stérile 4 mL de milieu liquide LB concentré à 10X et 40 µL d'antibiotique concentrée à 50 mg/mL. Mélanger de façon à homogénéiser le milieu de culture.
- 16) Répartir 4 mL de milieu par tube cristal et repiquer 10 colonies obtenues sur la boîte « **Bactéries Transformées** » : on obtient ainsi 4 mL de milieu/colonie/tube cristal Clone°X, où X est compris entre 1 et 10. La boîte témoin « bactéries seules » est éliminée.
 - 17) Incuber les 10 tubes de cultures une nuit sous agitation 190 x rpm à 37°C.

(2) Extraction de l'ADN plasmidique des « Miniprep »

- 18) Utiliser le kit **NucleoSpin® Plasmid** et suivre la procédure « **5.1 - Isolation of high-copy plasmid DNA from E.Coli** » sans les étapes optionnelles, à partir de 2 mL de culture bactérienne de « Miniprep ».
- 19) Conserver les cultures bactériennes à 4 °C et de l'ADN extrait appelé « **p_m16S(0,9kb)** » ou « **p_GFP** » à -20°C

(3) Criblage par digestion du plasmide contrôle qPCR p_m16S (0,9 kb)

- 20) Préparer le mix de digestion dans un tube 1,5 mL conique et un volume final de 140 µL (10µL/tube + 3 témoins + marge d'erreur), à l'aide de 0,5 U d'enzyme de restriction PvuII concentrée à 10 U/µL et de 2X de tampon du fournisseur concentré à 10X. Ajuster à q.s.p 140 µL avec de l'eau versol stérile.
- 21) Dans 10 tubes 1,5 mL coniques nommés de « **Clone 1** » à « **Clone 10** » d'un volume final de 20 µL, mettre 10 µL de mix de digestion préalablement préparé avec 10 µL d'ADN extrait de chacune des 10 « Miniprep ».
- 22) Dans un tube 1,5 mL conique nommé de « **Clone_ND mini** » ou « **Témoin Clone_ND mini** » d'un volume final de 20 µL, mettre 10 µL d'ADN extrait d'une « Miniprep » et ajuster à q.s.p 20 µL avec de l'eau versol stérile.
- 23) Homogénéiser par cycle d'aspiration et de refoulement doux et incuber pendant 1h30 à 37°C.

(4) Sélection des clones d'intérêt

- 24) Réaliser un gel d'Agarose à 1% à un volume final de 50 mL : 0,5 g d'Agarose 100X avec du tampon TAE 1X à qsp 50 mL. Une fois que le gel est sous forme liquide et homogène, ajouter à qsp 50 mL en tampon TAE 1X et 5 µL de GelRed™.
- 25) Couler le gel dans le moule adéquate auquel est ajouté deux barrettes de 20 puits. Laisser solidifier le gel pendant 30 minutes à TA ou pendant 10 à 15 minutes à 4°C.
- 26) Placer le gel muni de son socle dans une cuve d'électrophorèse et ajouter du tampon TAE 1X jusqu'à ce que le gel soit recouvert de quelque millimètre. Retirer la barrette de puits délicatement du gel et éliminer les bulles formées à l'aide d'une pointe de pipette.
- 27) Dans 10 tubes 1,5 mL coniques nommés de « **Clone 1 Gel** » à « **Clone 10 Gel** », mettre 20 µL de solution de « **Clone X** » avec 4 µL de tampon de charge BBPG 6X.
- 28) Dans un tube 1,5 mL coniques nommé « **Témoin Clone_ND mini Gel** », mettre 20 µL de solution de « **Clone_ND mini** » avec 4 µL de tampon de charge BBPG 6X.
- 29) Homogénéiser, centrifuger légèrement et déposer les échantillons sur le gel encadré d'un marqueur de taille.

Tableau 9 : Plan de dépôt sur du gel d'agarose des clones avec transformés

Marqueur	Clone ND	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Marqueur
12 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	12 µL

- 30) Lancer la migration des échantillons et du marqueur de taille à 100-110 V pendant 30 à 45 minutes.
- 31) Observer le gel sous une lampe UV munie d'une caméra et imprimer la photo du gel.
- 32) Selon profils recherchés, disponibles en **Figure 19**, valider la conformité de la taille des témoins ND mini (plasmides circulaires) et des plasmides digérés p_GFP (4373bp + 2311 bp)

Fiche Mémo°9

qPCR : EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

p_m16S(0,9 kb) (2826 bp + 1045 bp). Choisir un des clones ayant le bon profil pour l'amplifier en « midiprep ».

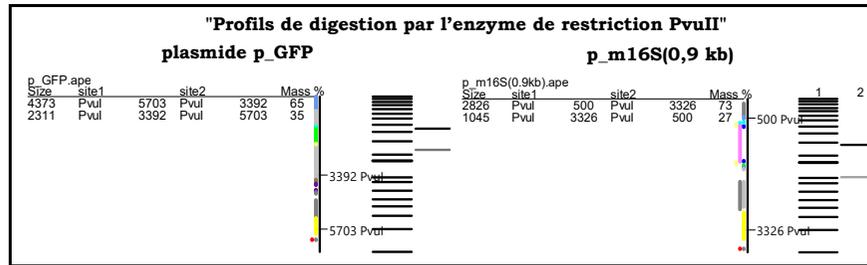


Figure 19 - Profils de digestion des plasmides p_GFP et p_m16S(0,9 kb) avec l'enzyme de restriction PvuII (logiciel ApE <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ap/>).

c) Technique des « Midiprep »

(1) Préparation des « Midiprep »

- 33) Préparer 100 mL de milieu LB concentré à 1X liquide et supplémenté avec de la Carbenicilline au 1/1000^{ème}. Pour cela, dans une bouteille en verre avec bouchon à viser stérile, mettre dans 90 mL d'Eau Stérile 10 mL de milieu liquide LB concentré à 10X et 100 µL d'antibiotique concentrée à 50 mg/mL. Mélanger de façon à homogénéiser le milieu de culture.
- 34) Répartir 50 mL de milieu dans 2 flacons de 50 mL et ajouter 200 µL de culture bactérienne du clone d'intérêt issu de la technique des « Miniprep » précédente. Remplacer le restant de culture à 4°C.
- 35) Homogénéiser, centrifuger légèrement et dévisser d'un quart de tour le bouchon et le maintenir sur la bouteille à l'aide de scotch.
- 36) Incuber une nuit sous agitation 190 x rpm à 37°C.

(2) Extraction de l'ADN plasmidique des « Midiprep »

- 37) Utiliser le kit **NucleoBond® Xtra Midi** et suivre la procédure « **7.1 – Purification des plasmides high-copy (Midi, Maxi)** », à partir de la totalité de la culture bactérienne préparée précédemment (100 mL), de la façon suivante :
 - Transférer 50 mL dans un flacon de 50 mL et centrifuger 10 minutes à 9 000 x rpm. Eliminer le surnageant (milieu usagé).
 - Transférer les 50 mL restant dans le « falcon + culot bactérien » et centrifuger 10 minutes à 9 000 x rpm. Eliminer le surnageant.
 - Poursuivre le protocole à l'étape 4 « Resuspension ».
 - Congeler pendant 5 à 10 minutes, décongeler et mesurer la DO.
 - Conserver l'ADN extrait appelé « **p_m16S(0,9kb)** » ou « **p_GFP** » à -20°C.

(3) Vérification de la conformité du plasmide purifié par « Midiprep »

Procéder par digestion avec l'enzyme Pvu II comme décrit pour les « miniprep » ci-dessus

Au besoin une vérification complémentaire par séquençage est possible en utilisation de la procédure de votre sous-traitant.

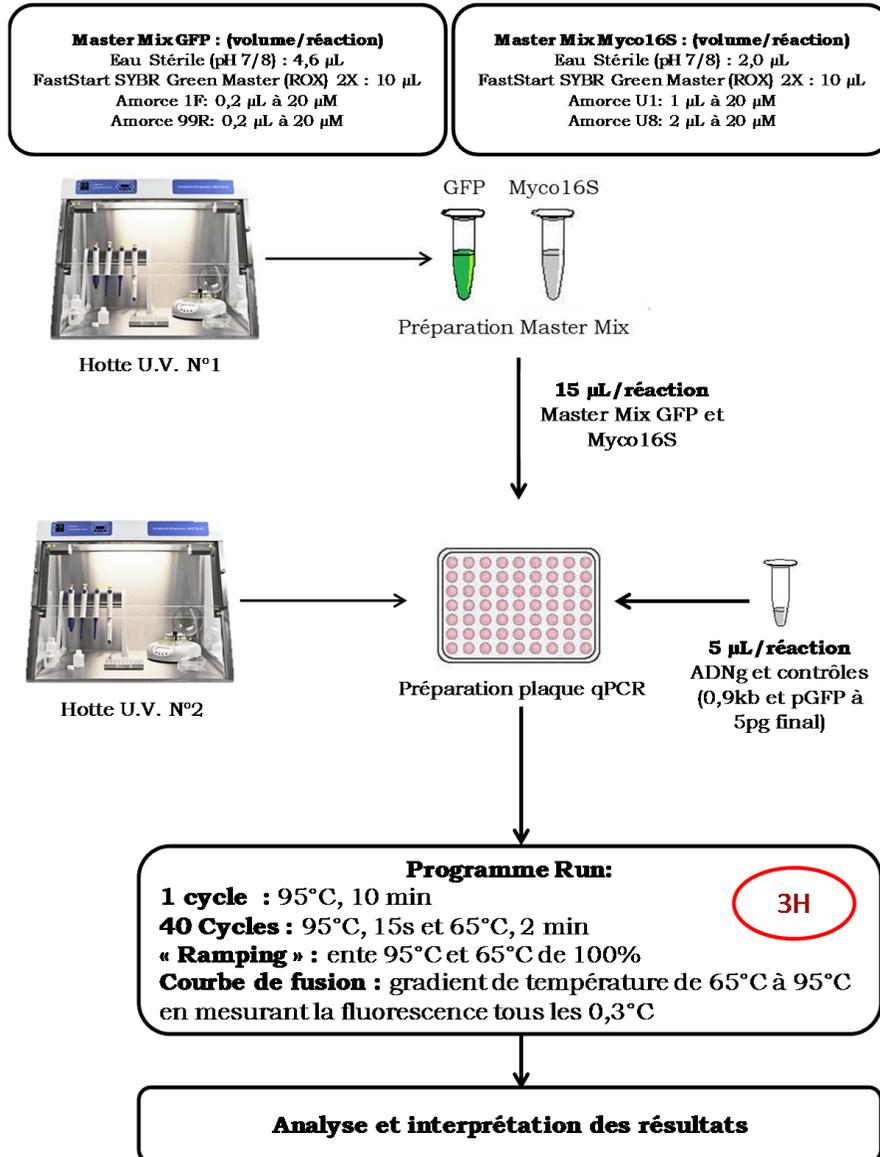


Protocole NucleoSpin® Tissue adapté à la qPCR Mollicutes/mycoplasmes

1 Préparation de l'échantillon		1 mL de culture 10 µL de plasmide pGFP à 10 pg/µL
2 Pré-lyse de l'échantillon		8 000 x g 5 min 180 µL T1 25 µL Proteinase K 56°C, 1 – 3 h
3 Lyse de l'échantillon		200 µL B3 96°C, 15 min
4 Ajuster les conditions de liaison de l'ADN		210 µL éthanol absolu
5 Liaison de l'ADN		Charger la totalité sur la colonne NucleoSpin® 11 000 x g 1 min
6 Lavage de la membrane de silice		1 ^{er} lavage 500 µL BW 2 nd lavage 600 µL B5 11 000 x g 1 min
7 Sécher la membrane		11 000 x g 1 min
8 Elution de l'ADN ultra pure		50 µL BE à 70°C TA 1 min 11 000 x g 1 min x 2
9 Dosage de l'ADN purifié		Doser l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre microvolume
10 Aliquotage		Répartir sous 25 µL/microtubes Conservation à -20°C

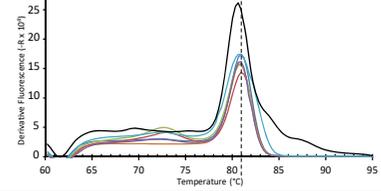
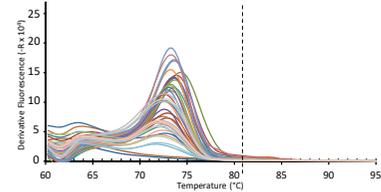
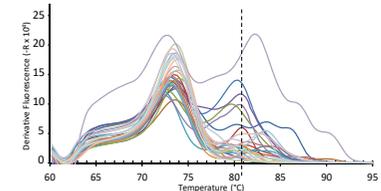
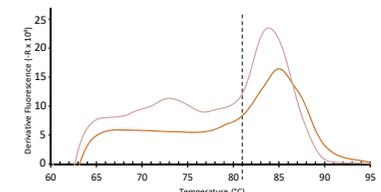
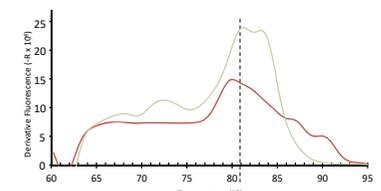
Fiche Mémo°10

qPCR GFP & 16S MYCOPLASMES



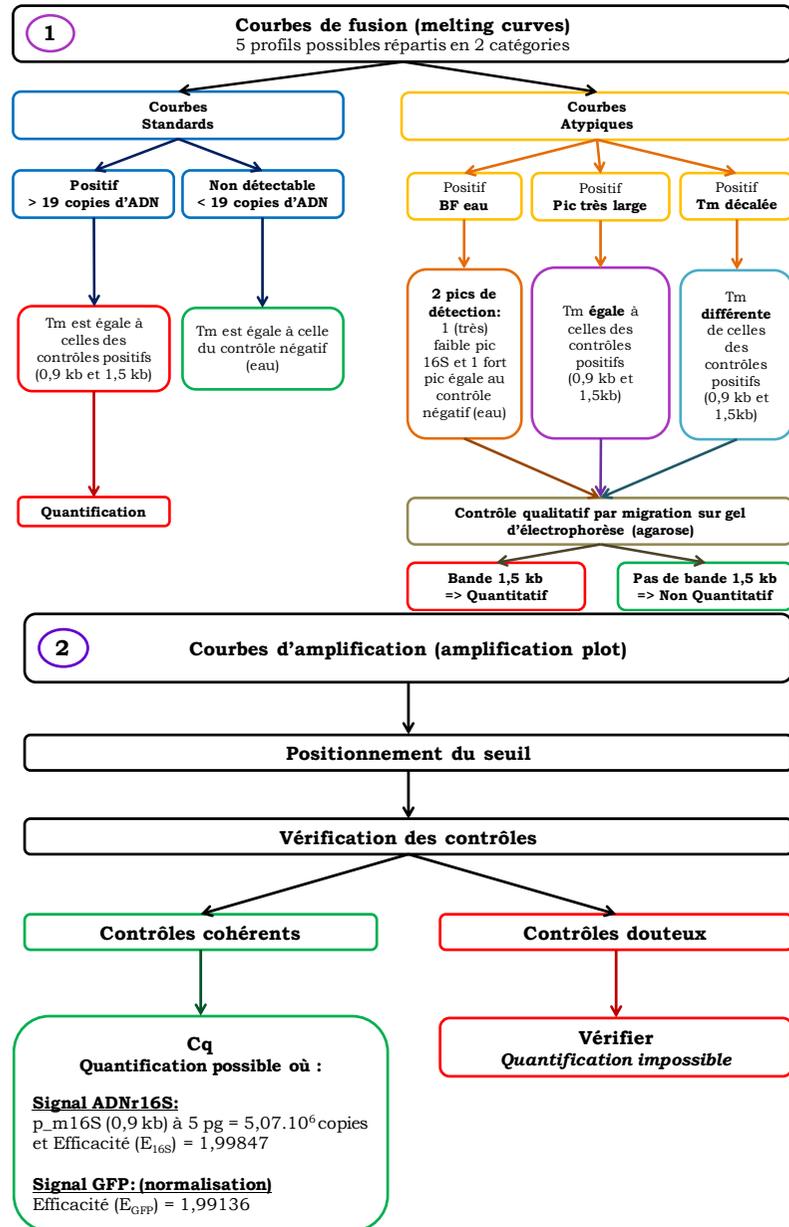
Fiche Mémo°11

qPCR : ANALYSE COURBES DE FUSION

Courbes de fusions possibles	Profils associés
	<p>POSITIF</p> <p>Détection du signal de l'amplicon du gène de l'ARNr 16S</p>
	<p>NON DETECTABLE</p> <p>Signal du dimère d'amorces</p>
	<p>ATYPIQUE CAS°1 FAIBLEMENT POSITIF</p> <p>Signal majoritaire du dimère d'amorces et un second signal de l'amplicon 16S cible</p>
	<p>ATYPIQUE CAS°2 Tm DECALEE</p> <p>Signal 16S ayant une T_m différente de celui de la référence p_m16S(0,9kb)</p>
	<p>ATYPIQUE CAS°3 PIC LARGE</p> <p>Signal de l'amplicon 16S associant un pic de dimère d'amorces et un large pic de type 16S</p>

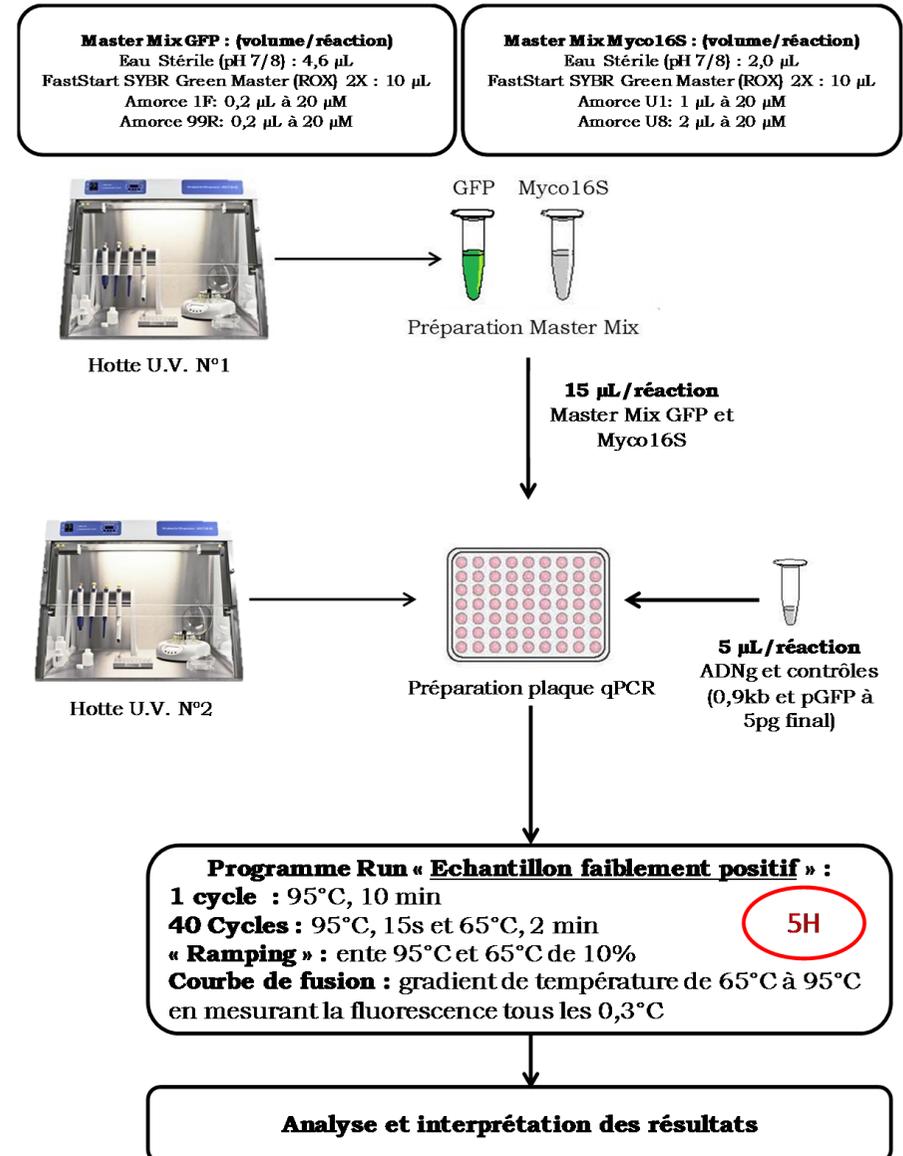
Fiche Mémo°12

ARBRE DE DECISION DANS L'ANALYSE QPCR



Fiche Mémo°13

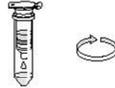
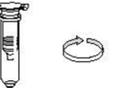
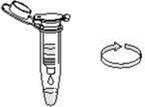
qPCR GFP & 16S MYCOPLASMES : ECHANTILLON FAIBLEMENT POSITIF



Fiche Mémo°12

PURIFICATION DES PRODUITS qPCR

Protocole NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

	Produit qPCR	Gel agarose
<p>1 Purification de produit de PCR : Ajuster 1 volume d'échantillon avec deux volume de tampon NTI</p> <p>Gel d'agarose: Récupérer les bandes de gel et les solubilisées, pour 100 mg de gel mettre 200 µL de tampon NTI</p>	 200 µL NTI/ 100µL produit qPCR	  200 µL NTI/ 100 mg de gel 50°C, 10 min
<p>2 Liaison de l'ADN</p>		11 000 x g 30s
<p>3 Lavage de la membrane de silice</p>		700 µL NT3 11 000 x g 30 s X2
<p>4 Séchage de la membrane de silice</p>		11 000 x g 1 min
<p>5 Elution de l'ADN</p>		20 µL NE à 70°C TA 1 min 11 000 x g 1 min X2

TABLES DES ANNEXES

Compte-rendu des résultats pour des surnageants cellulaires.....	84
Compte-rendu des résultats pour des surnageants infectieux.....	85
Brevet N° 15302MC	Erreur ! Signet non défini.
Publication N° PONE-D-16-25921	86

Lyon, le / /
Objet : Recherche de contaminations par les mycoplasmes.
Compte-rendu des résultats pour des surnageants cellulaires

Nom prénom :
Tél. :

Laboratoire :

Equipe :

Date de la demande :

Méthodes de recherches des mycoplasmes utilisées et résultats

Information sur l'échantillon				Recherche de Mycoplasme							
N° enregistrement qPCR	Ref du demandeur	Nature	Date	MycAlert	Plasmotest	Hoescht	qPCR Myco16S				
				enzyme	glycolipides	ADN extra nucléaire	Courbe de fusion de l'amplicon 16S	Cq	Amplicon 1,5 kb	Nb de copie génomique	Souche identifiée
	nom échantillon	surnageant cellulaire	de prélèvement	valeur ratio obtenu	positif, négatif ou douteux	positif, négatif ou douteux	%	oui, non ou douteux	oui ou non	valeur	nom souche

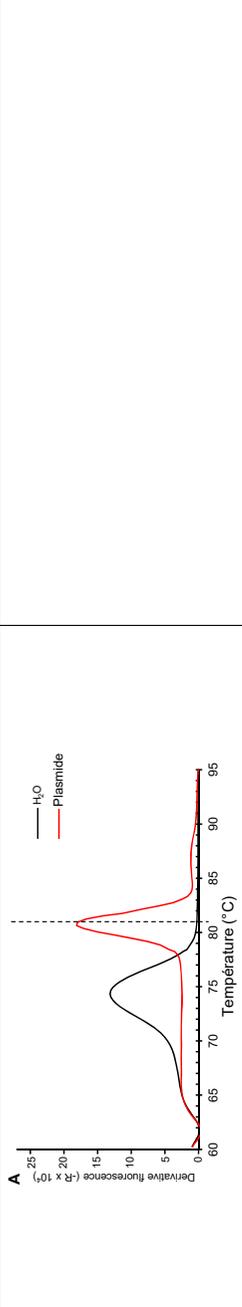
A Valeur <0,9 : <50 CFU/mL de mycoplasme(s)

C Valeur > 1,2 : mycoplasme(s) détecté(s)

B 0,9<Valeur<1,2 : résultat douteux, refaire le test après 48h de culture supplémentaire

D Ø : résultat indisponible

Données complémentaires de la qPCR Myco16S (Mollicutes) : Courbes de fusion de l'amplicon



Contrôles qPCR Myco16S : Eau (négatif) et plasmide (positif)

Conclusion générale des échantillons (4 méthodes) :

Echantillons testés

Nom et visa de l'expérimentateur :

Signature

Nom et visa de(s) vérificateur(s) :

Signature

SFR Biosciences (UMS3444 /US8)
Jacqueline MARVEL, Directrice
Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 7
Tél : 04 37 28 76 54, Fax : 04 37 28 76 57
E-mail : secretariat.ums3444@inserm.fr
Site : www.sfr-biosciences.fr

Lyon, le / /
Objet : Recherche de contaminations par les mycoplasmes.
Compte-rendu des résultats pour des surnageants infectieux

Nom prénom :
Tél. :

Laboratoire :

Equipe :

Date de la demande :

Méthodes de recherches des mycoplasmes utilisées et résultats

Information sur l'échantillon				Recherche de Mycoplasme							
N° enregistrement qPCR	Ref du demandeur	Nature	Génome	MycAlert	Plasmotest	Hoescht	qPCR Myco16S				
				Niveau BSL	enzyme	glycolipides	ADN extra nucléaire	Courbe de fusion de l'amplicon 16S	Cq	Amplicon 1,5 kb	Nb de copie génomique
	nom échantillon	Stock + nom famille de virus	(-)ssRNA, (+)ssRNA, dsRNA, dsDNA, ou ssRNA-RT	valeur ratio obtenu	positif, négatif ou douteux	positif, négatif ou douteux	%	oui, non ou douteux	oui ou non	valeur	nom souche

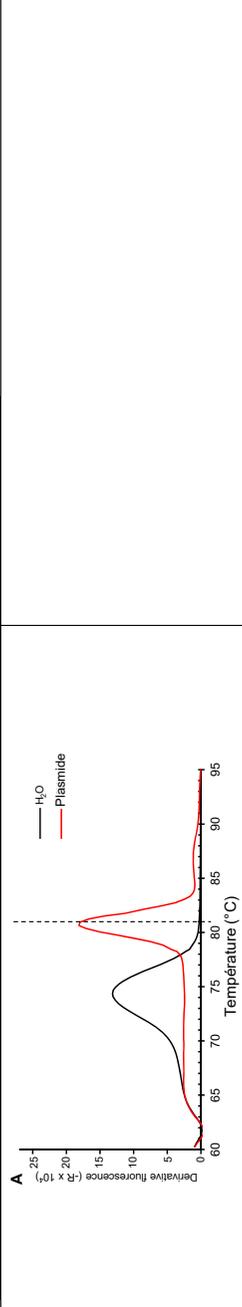
A Valeur <0,9 : <50 CFU/mL de mycoplasme(s)

C Valeur > 1,2 : mycoplasme(s) détecté(s)

B 0,9<Valeur<1,2 : résultat douteux, refaire le test après 48h de culture supplémentaire

D Ø : résultat indisponible

Données complémentaires de la qPCR Myco16S (Mollicutes) : Courbes de fusion de l'amplicon



Contrôles qPCR Myco16S : Eau (négatif) et plasmide (positif)

Conclusion générale des échantillons (4 méthodes) :

Echantillons testés

Nom et visa de l'expérimentateur :

Signature

Nom et visa de(s) vérificateur(s) :

Signature

SFR Biosciences (UMS3444 /US8)
Jacqueline MARVEL, Directrice
Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 7
Tél : 04 37 28 76 54, Fax : 04 37 28 76 57
E-mail : secretariat.ums3444@inserm.fr
Site : www.sfr-biosciences.fr

BREVET N° 15302MC

Inserm Transfert N°Brevet 15302MC

Method for universal detection and quantification of mycoplasma (Mollicutes) 16S rDNA by quantitative polymerase chain reaction amplifying a 1.5 kilobase fragment

PUBLICATION

This is a preprint version of a published work in PLoS ONE 12(2): e0172358(2017) (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172358>)

Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes.

Audrey Jean¹, Florence Tardy², Omran Allatif³, Isabelle Grosjean¹, Bariza Blanquier¹ and Denis Gerlier^{1,3*}

¹ Univ Lyon, SFR BioSciences, ENS de Lyon, Inserm US8, CNRS UMS344, UCBL, 50 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France.

² ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, VetAgro Sup, Univ Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy l'Etoile, France.

³ CIRI, International Center for Infectiology Research, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, LYON, France.

* Corresponding Author
E.mail : denis.gerlier@inserm.fr (DG)

Short title : Universal mycoplasma quantitative PCR

Keywords: Mycoplasma, Mollicutes, qPCR, Hoechst DNA staining, contamination, cell lines, virus, chloroplast.

Abstract.

Mycoplasmas (a generic name for *Mollicutes*) are a predominant bacterial contaminant of cell culture and cell derived products including viruses. This prokaryote class is characterized by very small size and lack of a cell wall. Consequently, mycoplasmas escape ultrafiltration and visualization under routine microscopic examination, hence the ease with which cells in culture can be contaminated, with routinely more than 10% of cell lines being contaminated. Mycoplasma are a formidable threat both in fundamental research by perverting a whole range of cell properties and functions and in the pharmacological use of cells and cell derived products. Although many methods have been developed, there is still a need for a sensitive, universal assay. Here is reported the development and validation of a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) based on the amplification of a 1.5 kb fragment covering the 16S rDNA of the *Mollicute* class by real-time PCR using universal U1 and U8 degenerate primers. The method includes the addition of a DNA loading probe to each sample to monitor DNA extraction and the absence of PCR inhibitors in the extracted DNA, a positive mycoplasma 16S rDNA traceable reference sample to exclude any accidental contamination of an unknown sample with this reference DNA, an analysis procedure based on the examination of the melting curve and the size of the PCR amplicon, followed by quantification of the number of 16S rDNA copies (with a lower limit of 19 copies) when relevant, and, if useful, the identification of the contaminating prokaryote by sequencing. The method was validated on a collection of mycoplasma strains and by testing over 100 samples of unknown contamination status including stocks of viruses requiring biosafety level 2, 3 or 4 containments. When compared to four established methods, the m16S_qPCR technique exhibits the highest sensitivity in detecting mycoplasma contamination.

Introduction

Cells lines and primary cell cultures are very frequently used as tools to unravel the molecular and cellular mechanisms that underlie biological processes, such as cell-invasion by viruses, microbes or parasites. In order to avoid biased interpretation of cell-based experiments, these tools should be kept under stringent quality scrutiny. Together with errors in cell line authentication, contamination by mycoplasmas is recognized as one of the two major pitfalls in cell culture. To give just one example, a survey of transcriptomic data deposited in NCBI Sequence Read Archive has shown that more than ten percent of the samples contained identifiable RNA from mycoplasmas meaning that many transcriptomic data have been published though being invalid (1). Mycoplasmas are wall-less prokaryotes of very small size with a DNA genome in the Mb range. They belong to the *Mycoplasmataceae* family, *Mycoplasmatales* order, *Mollicutes* class and *Tenericutes* division. Their small size favours their unnoticed cohabitation with culture cells and their plasticity allows them to pass through 0.2 μ m filters. Mycoplasma growth impedes many functions of eukaryotic cells with dreadful perturbation of data obtained in culture systems. They induce a cellular reprogramming of the transcriptome (1), change cellular metabolism, affect signal transduction, cell growth or apoptosis, DNA and RNA synthesis, all of these leading to perturbed data during biochemical and biological assays. Furthermore, virus growth can be either favoured or disfavoured (2). In nature, mycoplasma species can be either commensals or pathogens to humans, animals, and plants.

Detecting a mycoplasma contamination is not straightforward. Gold standards look for growth of mycoplasma colonies cultured on broth agar over several weeks and search for extra-nuclear DNA dots stained with Hoechst's

reagent. In both cases, this means days or weeks of culture to allow the growth of the mycoplasma until the colonies reach a size large enough to be seen macroscopically and microscopically, respectively. Other techniques have been developed, such as enzymatic- and bio-assays, ELISA, and polymerase chain reaction (PCR). These techniques are either cumbersome, difficult to interpret, of limited sensitivity and/or limited to the detection of only a limited range of species (3, 4). Furthermore their use to detect mycoplasma contamination in virus stocks can be difficult or even impossible for highly pathogenic viruses that have to be manipulated in biosecurity level (BSL) 3 or 4 containments. Here is reported a highly sensitive quantitative or real-time PCR termed m16S_qPCR. It is based on the selective amplification of a 1.5 kilobase DNA fragment using universal degenerate U1/U8 primers that target the mycoplasma 16S rDNA (5). In addition, it can be followed by a sequencing-based identification step. To validate the m16S_qPCR, hundreds of samples from either cell culture or BSL2 to BSL4 viral stocks were tested for mycoplasma contamination by this technique and whenever possible, compared with four other assays - Hoechst DNA staining, MycoAlert and PlasmatoTest and PCR. The limitations that have been found with the last four techniques and the detection of a case of contamination by a very unusual mycoplasma strain using m16S_qPCR are also reported.

Material and Methods.

Sample preparation and biosafety.

Supernatants of cell culture were prepared by harvesting cell free supernatants and further clearance of cell debris by centrifugation in 15 mL conical tubes at 200 g at room temperature for 5 minutes. They were kept frozen at -80°C until use. All samples were manipulated under a Type II laminar flow and biosecurity level laboratory containment (BSL2, 3 or 4) as required for the manipulation of cells and viruses until their full inactivation. Samples include routine checking for mycoplasma contamination in cell lines and virus stocks (or infected cells) of RNA viruses (measles, canine distemper, vesicular stomatitis, Ebola, Nipah, influenza, Crimean-Congo haemorrhagic fever, human T lymphotropic I, Drosophila C, Drosophila X, Mopeia, Puumala, Gypsy virus) and DNA viruses (Epstein Barr, BK virus).

DNA staining by Hoechst reagent.

The principle is to detect mycoplasma colonies growing adjacent to cells by visualizing DNA dots located outside the cell nuclei. The indirect assay was used as described previously (3). Briefly, a suspension of indicator cells was prepared by detachment from the tissue culture flask by a short trypsin-EDTA treatment, counting and resuspension into fresh tissue culture medium. To include suitable cell lines that can resist the cytopathic effect of several human viruses that our collaborators were working with, the assay was validated with five cell lines of different species origin (see Table 1 for details). Square (22 x 22 mm) sterile glass coverslips were deposited at the bottom of a 6-well microplate. Two mL of indicator cell suspension per well were allowed to adhere overnight before the addition of 0.2 mL of the cell-free sample to be tested. Cells were left to grow over 5-7 days in 5% CO₂ in humidified atmosphere at 37°C. When cells reach ~50-80 % confluence, the supernatant was carefully discarded, the cell monolayer was carefully washed once with PBS1X pH 7.2 and fixed for 10 min at RT by adding 2 mL of Ethanol/Acetic acid (3:1, vol:vol). The fixative was discarded and 2 mL of 2 µg/mL of Hoechst (bis Benzimide, Sigma cat. no. B-2883) solution diluted in PBS1X from a 500X stock solution kept aliquoted at -20°C, was added and incubated for 10 min at room temperature. The staining solution was discarded, and followed by two careful washes with clear water. After addition of 15 µL of FluoPrep (BioMérieux, cat.n. 75521), the coverslip was transferred onto a glass slide so as to have the cell monolayer in contact with the slide. The slide was examined by UV epifluorescence microscopy (360 nm excitation filter and barrier filter allowing 490-500 nm emission, 100X oil objective). Multiple fields were recorded for the absence or presence of fluorescent dots. Biohazard: paraformaldehyde and Hoechst solutions and UV microscope are hazardous. Since the adaption of this procedure by using Ibidi polymer coverslips (Biovalley, cat n. 80826, n. 80446) instead of glass coverslips was unsuccessful, the Hoechst staining assay could not be used in either BSL3 or BSL4 containment according to the local biosafety regulations.

Table 1. Indicator cell lines for mycoplasma detection using indirect Hoechst' staining

Name	Species	Culture medium ¹	cells/well ²
MeWo (6)	Human	RPMI 1640 Glutamax-I, 10% fetal calf serum, 1% Sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 10 mM HEPES pH7.2	4x10 ⁴
Vero (7)	Monkey	DMEM GlutaMax-I, 10% fetal calf serum	8x10 ³
IgH-2 (8)	Iguana	EMEM, 2 mM Glutamax, 10% fetal calf serum 1% non-essential amino acids	6x10 ³
NIH3T3 (9)	Mouse	RPMI 1640 Glutamax-I, 5% fetal calf serum	4x10 ³
CHO (10)	Hamster	Ham's F-12 Nutrient Mixture, 10% fetal calf serum	4x10 ³

¹ in humidified incubator, in the presence of 5% CO₂ at 37°C

² amount of cells to be seeded in 2 mL of culture medium in 6 well-plates.

Detection of mycoplasma specific enzyme using MycoAlert.

The principle is to detect a mycoplasma specific enzyme using a luciferase-based assay. The procedure was performed as recommended by the manufacturer (http://bio.lanza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_MycoAlert_Mycoplasma_Detection_Kit.pdf). Critical step: samples should not be heated to avoid destruction of the mycoplasma enzyme. The reagent mixture should be vortexed and centrifuged to ensure homogeneity. Data were expressed as either below or above the 50 colony forming unit (CFU) threshold as defined by the manufacturer.

Detection of mycoplasma lipopeptides using PlasmatoTest.

The principle is to detect mycoplasma lipopeptides by Toll like receptor 2 (TLR2). This requires the use of a HEK-Blue-2 reporter cell line that stably expresses TLR2, which upon binding to a lipopeptide agonist activates the secretion of alkaline phosphatase. The secreted enzyme is detected by colorimetry. The procedure was performed as recommended by the manufacturer (http://www.invivogen.com/PDF/PlasmatoTest_rep_pt1_TDS.pdf). HEK-Blue-2 cells should be used at least 2 days after passaging and before reaching 80% confluency.

Plasmid DNAs used as controls for m16S_qPCR.

The p_GFP plasmid coding for the green fluorescent protein described elsewhere (11) was used as a DNA loading tracer during DNA purification.

The 1514 bp 16S rDNA fragment from *M. capricolum* subsp. *capricolum* strain California Kid (gi_83283139) was subcloned using U1 and U8 degenerate primers (Table 2) (5) in the EcoR V restriction site of pBSK(+) to give p_m16S(1.5kb). This plasmid was further digested by Eco47III to delete a 601 bp internal fragment to give p_m16S(0.9kb). The 16S rDNA insert was fully sequenced in both plasmids. The p_m16S(0.9kb) plasmid was used as the positive reference DNA for m16S_qPCR because it can be traced as a possible accidental contaminant by determining the much shorter amplicon size it will give.

Table 2. Sequences and optimal amounts of GFP and mycoplasma 16S primers for their use in real-time PCR

Primer name	Primer sequence*	Final concentration	Reference
16S U1 (forward)	5' – GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAAC – 3'	1 µM**	(5)
16S U8 (reverse)	5' – GAAAGGAGGTRWTCACAYCCSCAC – 3'	2 µM***	(5)
GFP_for	5' – ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA – 3'	0.2 µM	(12)
GFP_rev	5' – CTCGCCGGACACGCTGAACT – 3'	0.2 µM	(12)

* **Y** = C or T; **D** = T, A or G; **R** = A or G; **W** = A or T; **S** = C or G.

** or 0.17 µM of each individual sequence assuming equal proportion of concatenated nucleotide species at the degenerate position during oligonucleotide synthesis

*** that is 0.125 µM of each individual sequence

Detection of Mycoplasma 16S rDNA using m16S_qPCR according to the rules of good laboratory practice MIQE guidelines (13-15) (protocol at a glance).

Critical step: Use Low Binding filter tips and tubes to maximize sample recovery and avoid DNA cross-contamination.

DNA extraction from samples.

- Add 10 µL of p_GFP (10 pg/µL) as DNA loading tracer to 1 mL of cell-free supernatant sample into 1.5 mL Low Binding conical tube, and vortex.
- Centrifuge at 8,000 g exactly for 5 min at RT.
- Carefully discard the supernatant to spare the very small pellet (maybe difficult to see)
- Lyse the pellet using 180 µL of Lysis Buffer T1 from the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, cat. No. 740952) by repeating pipetting.
- *In the case of BSL3 or BSL4 samples, transfer the supernatant into a new 1.5 mL tube.*
- Add 25 µL of Proteinase K and vortex vigorously.
- Incubate at 56°C for at least one hour with frequent vortexing.
- *In the case of BSL3 or BSL4 samples, transfer the supernatant into a new 1.5 mL tube.*
- Add 200 µL of Lysis Buffer B3 and vortex vigorously.
- Incubate at 96°C for 15 min.
- Vortex briefly.
- *In the case of BSL3 or BSL4 samples, transfer the supernatant into a new 1.5 mL tube. At this stage, the tube is ready to exit the BSL3 or BSL4 containment according to local biosafety regulations.*
- Add 210 µL of absolute ethanol and vortex vigorously. White filaments may appear.

- Transfer the whole sample (~500 μ L including white filaments) onto a NucleoSpin Tissue column above a collector tube.
For the next steps the following alternative procedure given by manufacturer has been selected.
- Centrifuge at 11,000 g for 1 min at RT.
- Discard the flow through solution from the collecting tube.
- Add 500 μ L of Wash Buffer B5 on the column.
- Centrifuge at 11,000 g for 1 min at RT.
- Discard the flow through solution from the collecting tube.
- Add 600 μ L of Wash Buffer B5 on the column.
- Centrifuge at 11,000 g for 1 min at RT.
- Discard the flow through solution from the collecting tube.
- Centrifuge at 11,000 g for 1 min at RT and throw the collector tube.
- Put the column on the top of a 1.5 mL Low Binding conical tube.
- Add 50 μ L of Elution Buffer BE heated to 70°C on the column and incubate for 3 min at RT.
- Centrifuge at 11,000 g for 1 min at RT.
- Add 50 μ L of Elution Buffer BE heated to 70°C on the column and incubate for 3 min at RT.
- Centrifuge at 11,000 g for 1 min at RT.
- *If not yet done, at this stage the conical tube containing 100 μ L of purified DNA is ready to exit the BSL3 or BSL4 containment according to the local biosafety regulations*
- Aliquot the DNA solution in four 0.5 mL Low Binding conical tubes (25 μ L/tube) and kept them frozen at -20°C until use.
- Discard the flow through solution from collecting tube.

Real-time PCR of GFP DNA loading probe

- **Critical point:** Wear gloves and use an UV hood#1 solely dedicated to "master mix" for PCR. Treat all the material with UV for 10 min before starting. Do not stock forward and reverse primers as a mixture.

Carry out a master mix with primers "GFP" by adding reagents as shown in Table 3. Vortex the solution and centrifuge for foamless solutions. This GFP mixed master (Green Fluorescence Protein) allows normalization of results by a GFP plasmid DNA reference.

- (see Table 2 for primer sequences)

➤ **Table 3. Master Mix GFP qPCR components**

Master Mix GFP	Final Concentration	Volume per reaction tube (μ L)
Sterile nuclease-free water (pH 7/8)		4.6
FastStart SYBR Green Master (ROX) 2X (Roche, cat.no. 4913850001)	1X	10
Primer GFP_for (20 μ M)	0.2 μ M	0.2
Primer GFP_rev (20 μ M)	0.2 μ M	0.2

Real-time PCR of mycoplasma 16S rDNA using U1/U8 universal degenerate primers (m16S_qPCR)

- ❖ The qPCR is performed as described above for GFP DNA except for the composition of the SYBR Green/Primer mix.

Prepare the master mix for the primers "m16S" by addition of reagents as shown in Table 4. Vortex the solution and centrifuge for foamless solutions. m16S targets 1.5 kb of the 16S ribosomal DNA of *Mollicutes*. (see Table 2 for primer sequences)

Table 4. Master Mix m16S qPCR components

Master Mix m16S	Final Concentration	Volume per reaction tube (μ L)
Sterile nuclease-free water (pH 7/8)		2
FastStart SYBR Green Master (ROX) 2X (Roche, cat.no. 4913850001)	1X	10
Primer U1 (20 μ M)	1 μ M	1
Primer U8 (20 μ M)	2 μ M	2

(see Table 2 for primer sequences)

- Vortex, then shortly centrifuge the SYBR Green/Primer mix to eliminate any foam.
- **Critical point:** Wear gloves and use an UV hood#2 solely dedicated to "prepare qPCR plate". Treat all the material with UV for 10 min before starting. Do not stock forward and reverse primers as a mixture.
- Add 15 μ L of master mix "GFP" or "m16S" to each well of a MicroAmp Fast optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems, cat. no. 4346906).

- Add in duplicate 5 μ L of either water, or p_GFP (at 1 ng/mL) or p_m16S (at 1 ng/mL) or samples.
- Carefully close each well by covering the plate with one MicroAmp Optical adhesive Film.
- Centrifuge shortly the plate for 10 s to bring mixtures at the bottom of the well.
- Run the qPCR according to Table 5 in a StepOne Plus (Applied Biosystems) with standard low ramping (3 hours to complete a run).

➤ **Table 5. Run program steps for the detection of 16S rDNA of mollicutes adapted from (5)**

Cycle Number	Step	Temperature	Period
1 cycle	Activation of the enzyme	95°C	10 min
40 cycles	Denaturation	95°C	15 s
	Hybridization / Elongation	65°C	2 min
			Data collection

Data are collected and curves are generated with StepOne software (Applied). Each reaction is carried out in duplicate. The analysis of amplicon strand dissociation is performed at the end of the run to visualize amplification specificity. To optimize the melting curve, the fluorescence is acquired at every 0.3°C during a 65°C to 95°C temperature gradient.

- Quantification cycle (Cq) method determination: manually set the threshold above the background on the lower limit of exponential phase of kinetic amplification. Cq is the crossing point between threshold and kinetic.

In order to determine primers efficiencies, a template qPCR reaction is performed for each primer couple and then diluted to generate linear standard curves. Primer efficiencies are reported in Fig 1.

Relative quantities of DNA copies are calculated using primer efficiency (e) according to the mathematical model of Pfaffl (16).

In the case of doubtful results from the analysis of the melting curve, the qPCR programme is modified by adding a 10% ramping time between denaturation at 95°C and hybridization/elongation time at 65°C. At the end of the PCR, the plate is kept frozen until further use.

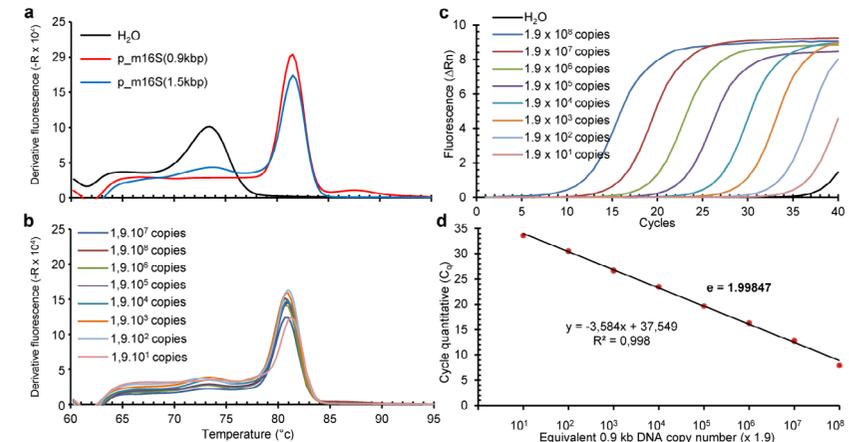


Fig 1. Melting curves and amplification plots of 16S rDNA amplicons resulting from PCR using U1/U8 primers. Melting curves obtained using p_m16S(0.9kb), a plasmid containing internally deleted 16S rDNA from *M. capricolum* subsp. *capricolum* strain California Kid (gi_83283139) (a), their reproducibility over multiple quantifications (b), with the amplification plot (c) and the linear regression analysis of Cq as a function of DNA copy input number (d, efficacy $E_{m16S}=1.99847$). For (c) and (d), dilutions were done from a freshly prepared 0.9 kb PCR amplicon obtained from 5 pg of p_m16S(0.9kb) using running conditions depicted in Table 2 and Table 5 with DNA concentration measured by NanoDrop™ (<http://www.nanodrop.com>).

Size determination of m16S PCR amplicons and sequencing.

The amplicons generated during the m16S_qPCR were analysed by electrophoresis in an agarose gel essentially as detailed in (3, 5) except for the use of GelRed (https://www.brunswick-ch.com/pdf/news/BI_GelRed.pdf) to visualize DNA bands under a UV table equipped with a digital camera.

Amplicons of 1.5 kb size were recovered using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSgelPCR.pdf) according to the manufacturer recommendations and sequenced by Sanger's method.

Calculation of Sensitivity and Specificity. T

They were calculated as reported (17, 18). True positive samples include samples found to be positive in all methods and samples found to be positive with the qPCR method and/or for which the mycoplasma contamination status was known. True negative samples include samples found to be negative in all methods and samples found to be negative by at least qPCR with the exception of three samples for which the very low contamination status was known because of having been intentionally contaminated (i.e. labelled as false negative). Statistical analysis for differences in proportion was performed using Fischer's test.

Results and Discussion

Because of the need of many colleagues working with cell lines and viruses requiring BSL2 to BSL4 biosafety levels, the aim was to find and to implement a mycoplasma detection assay sensitive enough that it could be used universally. Within CelluloNet BioBank, the indirect Hoechst staining assay based on the human MeWo cell line (6) (ECACC ref. 93082609) as cell indicator and MycoAlert are routinely used. Several intrinsic limitations were encountered. MeWo cells are destroyed by many viruses, thus preventing their use as universal reporter cells. At least one mycoplasma strain (unfortunately not genotyped as it was observed prior to the setting of m16S_qPCR) was found by serendipity to escape detection by MycoAlert. Furthermore adapting the Hoechst staining assay to BSL3 and BSL4 pathogens appears to be very difficult owing to stringent biosafety rules. Testing the suitability of a new method called Plasmotest based on the detection of mycoplasma lipopeptides was then considered. This assay looks in principle rather easy to perform with pathogenic material since prior to the test, samples should be heat-inactivated for 15 min at 100°C, i.e. a condition where all human viruses are destroyed if one excludes prions. This assay proved to be useful but suffers from limited sensitivity and from relying on maintenance of a reporter cell line. Alternatively, it was reasoned that, theoretically, it might be feasible to implement the universal PCR detection that was developed using universal U1 and U8 degenerate primers targeting the 16S rDNA of *Mollicutes* by Johansson et al. (5) and improve its sensitivity by performing the PCR in real-time. It was first confirmed that all mycoplasma strains with recorded 16S rDNA from GenBank and SILVA databank (19) can be targeted by blasting with U1 and U8 primers. Furthermore a BLAST search in SILVA with up to five mismatches located upstream to the last 3' fifth nucleotide of each primer recovered the same set of *Mollicutes* enriched with some related bacteria including cyanobacteria and chloroplasts (Table S1).

To establish a Real-Time PCR with U1/U8 degenerate primers, the 1.5 kb long 16S rDNA from *M. capricolum* subsp. *capricolum* strain *California Kid* (gi_83283139) by was amplified using U1 and U8 primers and the resulting DNA amplicon was subcloned into a plasmid named p_m16S(1.5kb). From this plasmid, the p_m16S(0.9kb) plasmid was derived by internal deletion within the 16S rDNA. The use of the PCR parameters described in (5) gave unsatisfactory results in qPCR. The hybridization/elongation temperature (see Fig. S1) and the amount and the concentration of U1 and U8 primers were therefore optimised. A satisfactory homogenous dissociation curve clearly different from that obtained with water was obtained. This latter non-specific melting curve reflects the formation of primer dimers in the absence of target DNA likely due to both the high primer concentration and their degeneracy. While primer dimers were detected with a $T_m = 74 \pm 0.44$ °C, an m16S rDNA amplicon was found to peak at 80.8 ± 0.15 °C (Table 6). When run on p_m16S(0.9kb), the Cq linearly correlated with the copy number of p_m16S(0.9kb) DNA input (Fig 1a-d). Importantly the melting curves obtained with p_m16S(1.5kb) and p_m16S(0.9kb) peaked at the same T_m despite the 0.6 kb difference in the amplicon size (see below for size confirmation). This optimized method was called "m16S_qPCR". That a Real-Time PCR of long DNA fragments can be performed with non-degenerate primers has been independently reported to detect two bacterial non-ribosomal genes (20, 21).

Table 6. Mean and SD values of C_T and T_m from amplification plot and melting curves observed with p_GFP and p_16S(0.9kbp) used as DNA load and 16S positive controls respectively

Primers	DNA source	Number of measurements	C_T (mean \pm SD)	T_m (mean \pm SD)
GFP	water	17	27.7 \pm 1.4	76.4 \pm 0.26
	p_GFP	15	17.6 \pm 1.5	83.5 \pm 0.05
16S U1/U8	water	21	34.4 \pm 2	74 \pm 0.44
	C16S p_m16S(0.9kbp)	18	19 \pm 1.6	80.8 \pm 0.15

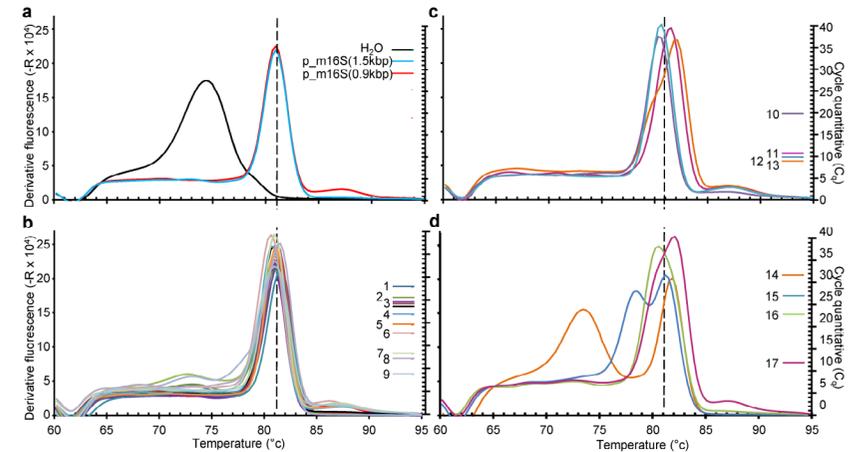


Fig 2. m16S Melting curve (left, curves) and Cq (right, ladder) values obtained with a DNA panel from several mycoplasma species showing diversity of the melting curve from similarity with p_m16S(0.9kb) positive reference (a, b), different T_m (c) and bimodal curves (d). (b) ¹ *M. imitans*; ² *M. canis*; ³ *M. arginini*, *M. salivarium*, *M. alkalescens*, *M. agalactiae*, *M. canadense*, *M. apicolum* subsp. *capricolum*; ⁴ *M. mycoides* subsp. *capri*; ⁵ *M. putrefaciens*; ⁶ *M. verecundum*; ⁷ *M. moatsii*, ⁸ *M. fastidiosum*; ⁹ *M. alvi*. (c) ¹⁰ *M. ovipneumoniae*; ¹¹ *M. iguana*; ¹² *M. mycoides* subsp. *mycoides*; ¹³ *M. opalescens*. (d) ¹⁴ *M. yeatsii*; ¹⁵ *M. columborale*; ¹⁶ *M. lipofaciens*, ¹⁷ *M. fermentans*. T_m peak of 16S rDNA amplicon is indicated by the dotted line on each graph.

The ability of m16S_qPCR to detect and to quantify available DNA stocks from an internal mycoplasma collection was then tested. All samples with measurable DNA contents using Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFischer Scientific, cat. No. Q32851), i.e. >0.4 ng/mL, gave a measurable signal. Amplicons from most mycoplasma strain samples gave a melting curve that was identical with that observed with p_m16S(0.9kb) positive control (Fig 2a-c) peaking at ~81°C. Two other samples gave rise to amplicons exhibiting a small T_m shift (Fig 2c) and/or a double peak (Fig 2d) corresponding in one case of the presence of the primer-dimer peak at ~74°C due to the very low DNA content of this sample.

As the qPCR assay was using the same set of U1/U8 primers previously recommended for detection of mycoplasma (5), the relative sensitivity of the PCR and qPCR assay using the optimised PCR parameters was evaluated by testing serial dilution of a known mycoplasma contaminated cell free supernatant using the qPCR with either visualization of the resulting PCR product after electrophoresis in agarose gel (Fig 3a) or by analysing the final melting curve of the PCR product (Fig 3b). The qPCR was found to be ~4 times more sensitive than the classical PCR. According to this experiment and the sample used, the lowest amounts of genomic DNA copies that could be detected can be estimated to be ~700 genome copies. The sensitivity of PCR and qPCR was further investigated and compared to the indirect Hoechst staining, MycoAlert™ and/or Plasmotest™ detection assays. To ensure working with "true" mycoplasma free and contaminated samples, multiple flasks of a mycoplasma-free cell line were intendedly contaminated with either 1.5 or 15 colony forming units (CFU) of *Acholeplasma laidlawii*. Samples were harvested after 5, 8 and 12 days of cell culture and tested by every assay (Fig 4a). MycoAlert™ and Plasmotest™ were unable to detect mycoplasma in any sample whereas the Hoechst indirect assay indicated the presence of mycoplasma in cells inoculated with 15 CFU after 5, 8 and 12 days of culture and only after 12 days of culture after contamination with 1.5 CFU. A clear 1.5 kb band could be detected only after 12 days of culture of the highest mycoplasma inoculum (Fig 4b,c (insets) and Table 7). Whichever the duration of the culture and mycoplasma inoculum size, all contaminated samples were successfully detected by analysing the melting curve obtained in qPCR although quantification could be performed only after 12 day amplification in culture of the 15 CFU mycoplasma load (Fig 4, Table 7). If one assumes a constant generation time over the 12 days culture of cells inoculated with 15 CFU leading to 1.49×10^5 genomic copies per mL of the cell-free supernatant, the generation time of *Acholeplasma laidlawii* in cell culture conditions could be estimated to be ~12 hours. This value is much higher than the 1 h generation time reported in optimised medium conditions (22). While such a 12-fold difference can be due to partial recovery of the mycoplasmas from the cell culture, this suggests that mycoplasma growth in tissue culture may be slowed down possibly due to shortage of cell derived nutrients. From the 12 h generation time and assuming comparable and constant growth after inoculation with only 1.5 CFU of *Acholeplasma laidlawii* and 100% mycoplasma recovery from the flasks, the qPCR sensitivity to detect this mycoplasma strain in cell culture supernatant obtained by melting curve examination appears

to be as low as an estimated ~1-2 genomic copies present at 5 d.p.i. after the lowest inoculum of *A. laidlawii*, i.e. close to the 19 copies limit that can be quantified in 5 μ l of a DNA solution using the p_m16S(0.9kb) reference (see Fig 1).

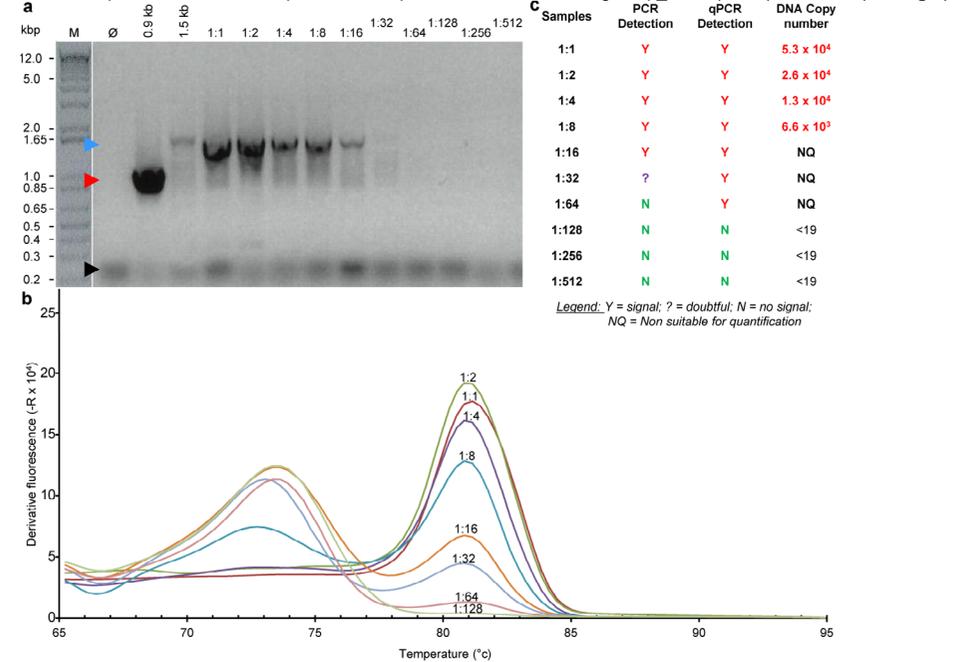


Fig 3. Relative sensitivity of qPCR and PCR using parameters optimized for qPCR. (a) PCR product imaging after electrophoresis on agarose gel and staining. (b) Melting curves of qPCR samples (c) Table summarising data illustrated in (a) and (b). A cell culture supernatant known to be contaminated by mycoplasma was serially diluted and a sample of each dilution was run on qPCR. At the end of the qPCR run, the obtained qPCR product from each sample was analysed on agarose gel as standard PCR products.

Table 7. Comparison of the sensitivity of five mycoplasma detection assays. MeWo cells were inoculated with either culture medium (Medium) or 1.5 or 15 CFU of *Acholeplasma laidlawii* (A.I.). Cell free supernatants were collected after 5, 8 or 12 days of culture and tested with the various assays (see also Fig 4 for details).

Seeding at day 0	Days in culture	MycoAlert	PlasmoTest	Hoechst	PCR	qPCR	
						Detection	Quantification
Medium	5	N	N	N	N	N	NQ
	8	N	N	N	N	N	NQ
A.I. 1.5 CFU	5	N	N	N	N	Y	NQ
	12	N	N	Y	N	Y	NQ
A.I. 15 CFU	5	N	N	Y	Trace ?	Y	NQ
	12	N	N	Y	Trace ?	Y	NQ
							$1,29 \times 10^5$

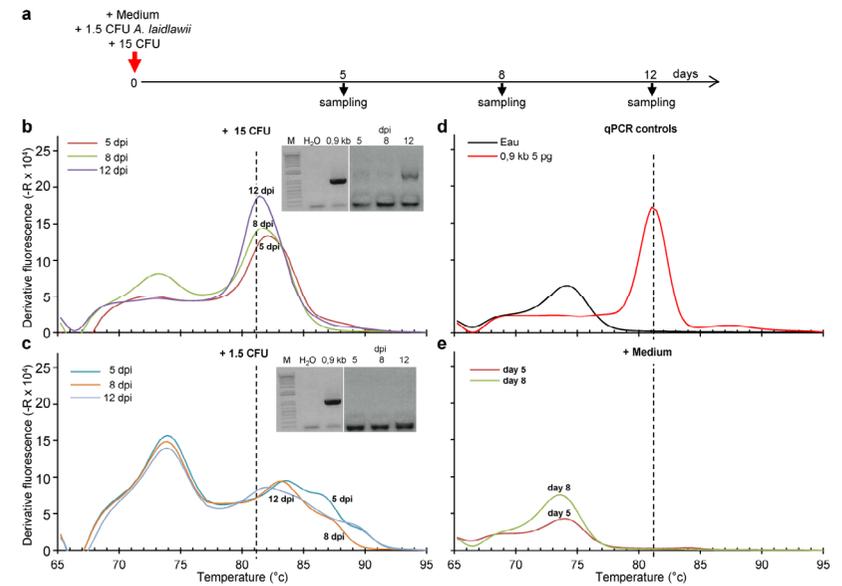


Fig 4. Comparison of the sensitivity of PCR and qPCR assays. MeWo cells (1.5×10^6) seeded one day before in 25 cm^2 tissue culture flasks were inoculated with either culture medium (Medium) or 1.5 or 15 CFU of *Acholeplasma laidlawii* (A.I.). Cell free supernatants were collected after 5, 8 or 12 days of culture (a) and DNA was extracted and analysed by qPCR and visualization of PCR products after electrophoresis on agarose gel (b-d). (see also Table 7).

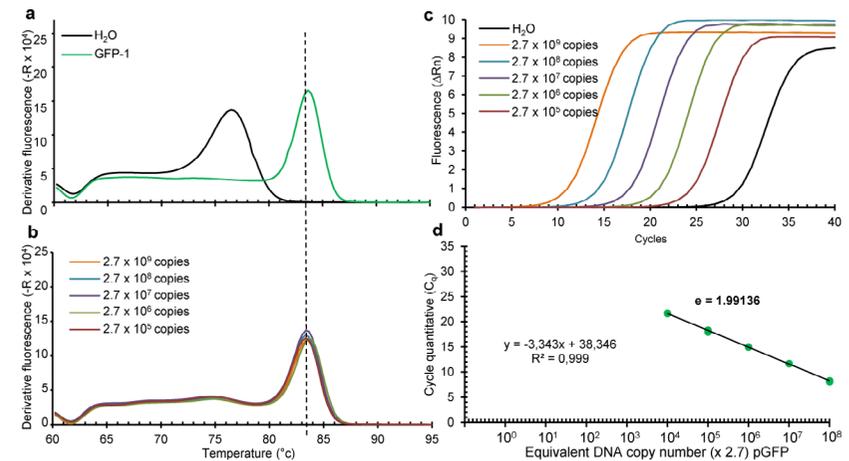


Fig 5. Melting curves and amplification plots of GFP DNA amplicons resulting from PCR using GFP. Melting curves obtained using p_GFP (a), their reproducibility over multiple quantification runs (b) with the amplification plot (c), and the linear regression analysis of Cq as a function of DNA copy input number (d, efficacy $E_{GFP}=1.99136$) Tm peak of GFP amplicon is indicated by the dotted line. For (c) and (d), dilutions were done from a freshly prepared 99 bp PCR amplicon obtained from 5 pg of p_GFP using running conditions depicted in Table 2 with DNA concentration measured by NanoDrop™ (<http://www.nanodrop.com/>).

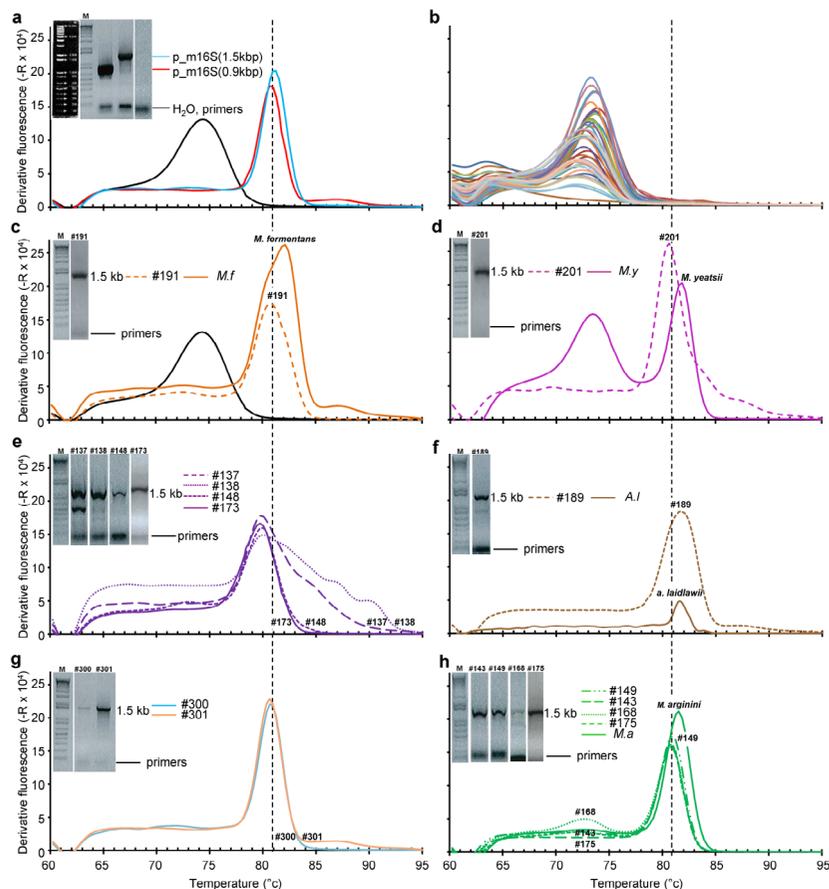


Fig 6. Dissociation curves of m16S qPCR and amplicon size (insets) of DNA samples from cell-free supernatants and/or virus stocks and comparison with DNA from mycoplasma cultures when available with controls (a), samples (# follow by number) without detectable mycoplasma 16S rDNA (b) *M. fermentans*, (c), sample(s) with contaminated *M. yeatsii* (d) *M. hyorhinitis* (e), *A. laidlawii*, (f), *M. cottewii* (g) and *M. arginini* (h). For sake of clarity, only corresponding amplicons run on agarose gel electrophoresis are shown in the inset with the 1 kb ladder markers (11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.65, 1, 0.85, 0.65, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2 and 0.1 kb dsDNA) shown lane M in (a). T_m peak of 16S rDNA amplicon is indicated by the dotted line on each graph.

To evaluate to what extent m16S_{qPCR} can be routinely used to detect mycoplasma contamination of cell cultures and virus stocks, about one hundred cell-free supernatants or virus stocks were analysed and the results were compared with those obtained using the indirect Hoechst staining, MycoAlert and/or Plasmotest detection assays whenever technically possible. Since the first step of m16S_{qPCR} required DNA purification from the unknown samples, a small amount of p_{GFP} was added to each sample prior to DNA extraction. The use of this DNA loading probe allowed us to ensure recovery of DNA free from PCR inhibitors from every sample by running GFP-specific qPCR as illustrated in Fig 5. When run using the m16S_{qPCR} method no amplicons other than that of the primer dimers were amplified from 5 pg p_{GFP} plasmid thus validating this DNA loading probe as being neutral (S2 Fig).

DNA extracted from most of the unknown samples and run using m16S_{qPCR} showed only the melting curve of the primer dimer (Fig 6a, b, see the amplicon sizes in the inset in a for water, p_{m16S}(0.9kb) and p_{m16S}(1.5kb) controls). Those samples were considered to be below the limit of 19 “16S rDNA” copies/ sample. An m16S rDNA amplicon exhibiting a melting curve peaking at ~81°C was detected in 14 samples (Fig 6 c-h). Amplicon size was determined after agarose electrophoresis (Fig 6, insets) and found each time to be ~1.5 kb long, thus excluding a

possible contamination with the 0.9 kb amplicons from the positive p_{m16S}(0.9kb) reference (Fig 6, compare insets of panels c-h with that of panel a). Furthermore, sequencing revealed the presence of 6 different mycoplasma strains, namely *M. hyorhinitis*, *A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. yeatsii* and *M. cottewii* thus further excluding contamination by positive *M. capricolum* subsp. *capricolum* strain California Kid derived control. The contamination levels varied from 1.3×10^3 and 5.2×10^7 rDNA copies/mL of cell-free supernatant or virus stock, i.e. over a 4 log range. While the first four strains are known to be prevalent in contaminating cells in culture (see (23) and cited references herein), a contamination with *M. yeatsii* and *M. cottewii* came as a surprise. Indeed, their only known ecosystem is the auditory meatus (or external ear canal) of goats where there are commensal (24, 25) although they have been also found one or twice in bovine milk (26) and bovine lung tissue (27). A related species have been also recently detected in cultured chicken cells (28).

In 4 samples, the melting curve profile did show a small shoulder at a higher temperature than that of the melting curve of the primer dimer (Fig 7a). An additional PCR program was then developed, aiming at enhancing the signal that seems to peak around ~81°C in these doubtful samples. This consisted of introducing a 10% ramping for both 65°C to 95°C heating and the 95°C to 65°C cooling phases as shown in Fig 7a and b (left). This protocol has the disadvantage of increasing the overall PCR time by 50% but did not change the melting curves of the primer dimer and the positive control (Fig 7, compare right curves in a and b) In 3 cases, either the 81°C shoulder disappeared or was not notably improved. In one case a peak became clearly visible at ~81°C (Fig 7b). Correlatively, only the primer dimer band was detected in the 3 former samples while a 1.5 kb band could be visualized and sequenced from the fourth sample (Fig 7b, inset).

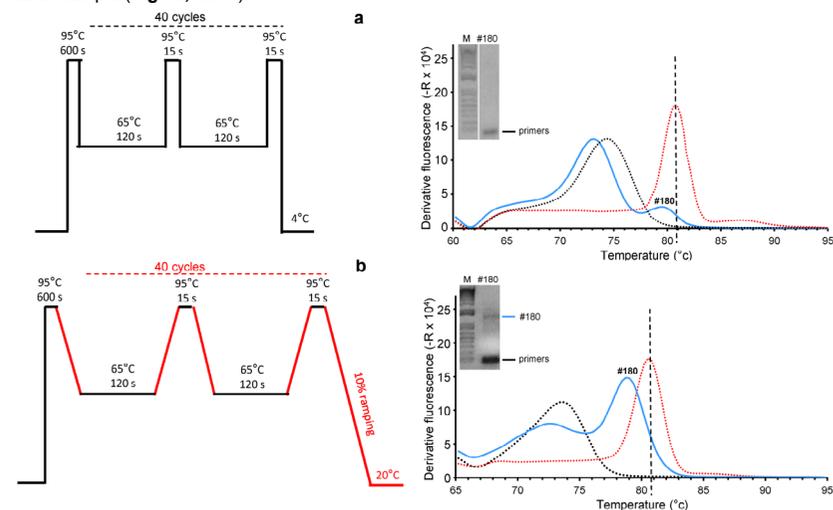


Fig 7. Improvement of mycoplasma DNA detection by slowing the temperature ramping during amplicon melting. Melting curve of sample #180 obtained after 100% ramping (a) and 10% ramping (b) with amplicon size determination (a,b, inset). Water and p_{m16S}(0.9kb) are shown in black and red dotted lines, respectively. T_m peak of 16S rDNA amplicon is indicated by the dotted line on each graph.

A few other prokaryotes can be also detected with the PCR as predicted by blasting U1 and U8 primers against bacterial genome databases (see S2 Table for list). This was experimentally verified from purified DNA from two *Fusobacterium necrophorum* strains, one *Fusobacterium nucleatum* strain, six *Streptococci*, *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium tuberculosis* (S3 Fig compare b-d with a, see also amplicon sizes in f). In contrast, and in agreement with prediction from blast studies, several other bacteria families were found to escape detection (S3e Fig). The detection of some bacteria other than mycoplasma in cell-free supernatants or virus stocks is an advantage since this will warn of a possibly latent bacterial contamination that is as undesirable as is a mycoplasma contamination. As a matter of fact, an accidental bacterial contamination was once detected by the 16S qPCR before it could be seen under the microscope in a tissue culture sample. The U1/U8 primer pair is however unsuitable for the detection of phytoplasmata because of a relative abundance of chloroplast DNA that is also targeted by these primers (see S1 Table and S4 Fig). This point has been blindly verified on 12 plant DNA samples contaminated or not with phytoplasmata and kindly provided by Nicolas Sauvion (INRA, Montpellier, France).

Among 87 cell-free supernatant or virus stock samples tested, ~17 % were found positive for mycoplasma contamination by m16S_qPCR. A few samples (4.6 %) could not be tested by any of the other three methods because of technical constraints. From the qPCR positive samples (that were also tested with one, two or three of the other assays, 4.6 % were also detected as being contaminated by mycoplasma and 8.05% escaped detection by one or two of other assays. Furthermore, 8 samples in which no 16S rDNA could be detected by m16S qPCR were found to give positive signals by one assay (or even by 3 different assays for one sample) and 2 with doubtful results for at least one assay (11.5 %). The 10 samples giving just above threshold signals by MycoAlert could not be confirmed using this assay upon testing of cells that have been infected by these viral stocks and it was speculated that concentrated stocks of enveloped viruses may contain a cell-derived enzymatic source of ATP resulting in possible signal bias using this test.

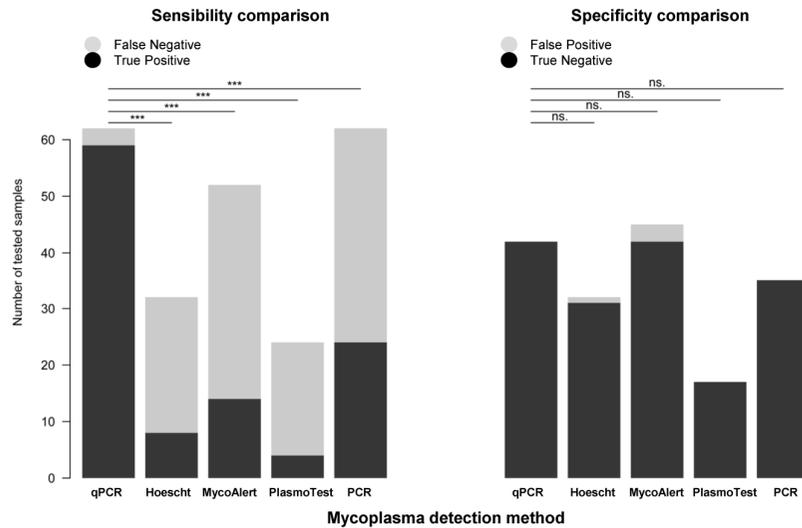


Fig 8. Sensitivity and specificity of five mycoplasma detection methods. The sensitivity of the qPCR test was significantly better than the four other tests (***, $p < 6.5 \times 10^{-12}$ and below, Fischer's test.). The specificity levels of all tests did not statistically differ (n.s., $p > 0.24$ and above, Fischer's test). See also material and methods section for details.

By taking into account the samples tested with their mycoplasma positive or negative status, the sensitivity and specificity were independently calculated for each of the five methods used to detect mycoplasma (Fig 8). The sensitivity of qPCR, Hoechst, MycoAlert, PlasmoTest and PCR is 95.2 %, 25.0%, 26.9%, 16.7% and 38.7%, respectively, with statistical analysis revealing a significant superiority of the qPCR over all other methods at $p < 6.5 \times 10^{-12}$ and below. The specificity is very good (98.8%-100%) for all tests. Importantly, those figures are relative to each other and their absolute values will be known only by retrospective analyses of much larger sampling size made by several independent laboratories.

In conclusion, the m16S_qPCR method to track contamination of cultured cells and cell derived products associates high sensitivity, a very broad range covering the entire *Mollicute* class and usefulness in controlling the absence of mycoplasma contamination of viral stocks requiring any level of biosafety containment. In addition it includes an internal DNA loading probe and a positive reference that is easily tracked in case of accidental contamination of the samples by this reference. A decision-making chart-flow has been built and adopted (Fig 9):

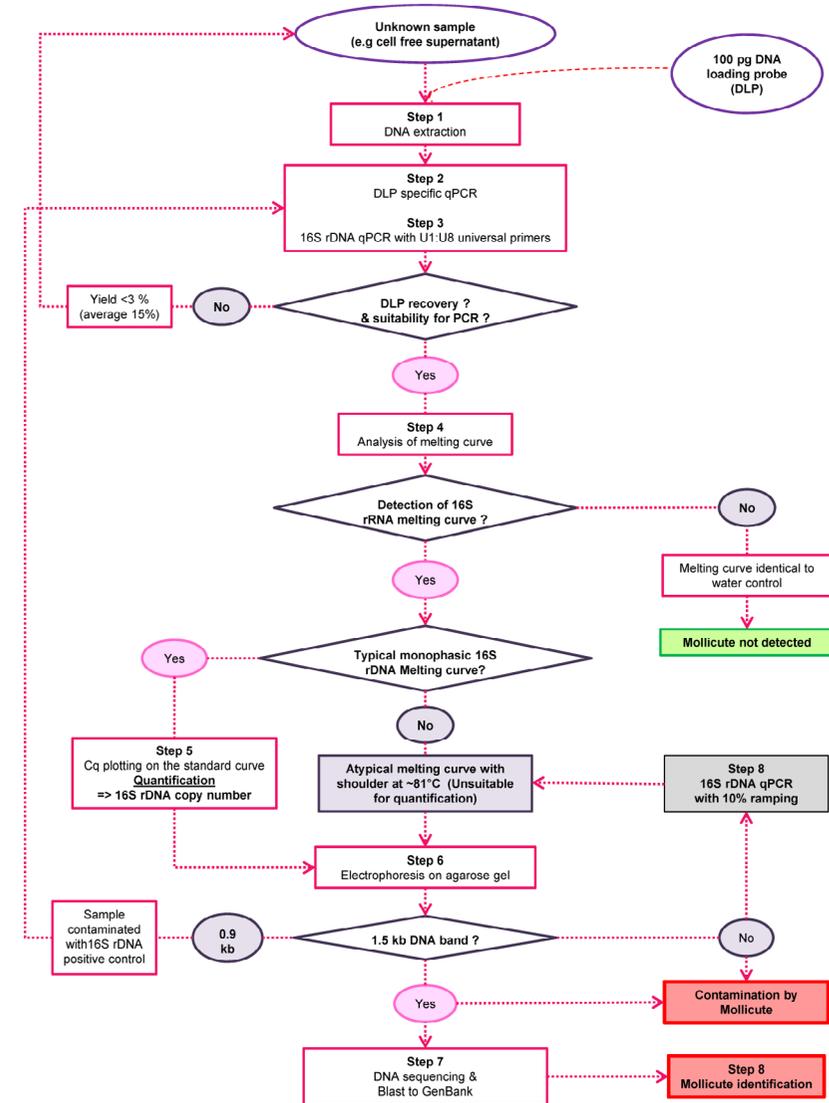


Fig 9. Workflow diagram of decision making

Step 1: A known amount of p_{GFP} as DNA loading probe is added to cell-free samples to be tested and DNA is purified.

Step 2: The efficiency of DNA purification and the absence of PCR inhibitors is determined by GFP-specific qPCR. In case of low or abnormal GFP signal, DNA purification is performed again.

Step 3: m16S-qPCR is run on the DNA sample, water as negative control and p_{m16S}(0.9kb) as reference positive DNA.

Step 4: Amplicon melting curve is analysed.

- 4(a) a melt curve identical to primer indicates lack of detectable mycoplasma contamination (<19 copies/sample) and no further analysis is required.
- 4(b) an atypical melt curve with a visible shoulder peaking around 81°C that suggests a 16S rDNA signal, go to step 6.*

- 4(c) a melt curve nearly identical to that obtained with p_{m16S}(0.9kb) positive control indicates mycoplasma contamination; go to step 5 for quantification.

Step 5: Cq plotting on standard curve gives the contamination level

Step 6: Check amplicon size by agarose gel electrophoresis

- 6(a) 1.5 kb amplicon size: mycoplasma (or bacteria) contamination is confirmed. Go to step 7.

- 6(b) no signal corresponding to a 1.5 kb amplicon size with small T_m shoulder at ~81°C indicates a low mycoplasma contamination.

- 6(c) 0.9 kb amplicon size: accidental contamination with 16S rDNA standard: go to Step 1 to run again the sample.

Step 7: Amplicon can be sequenced for identification of the prokaryote contamination.

* Note in case of a very low shoulder with a T_m ~81°C the m16S-qPCR can be run again on the sample but using the 10% ramping protocol (Step 8).

The universal m16S_qPCR procedure has several advantages over published available methods including those that are also based on PCR or multi-primer qPCR (4) that detect only subsets of *Mycoplasma* strains, by associating a very broad coverage of the *Mollicutes* and other phylogenetically related bacteria thanks to the use of validated U1/U8 universal primers (5) (our results and see **Table S1** and **S2**), a high sensitivity (>19 16S rDNA copies), the incorporation of a DNA loading probe, the use of positive reference control that is traceable and the possibility of strain identification to help find the origin of a contamination. Its usefulness and accuracy on cell free supernatants and stocks of viruses that require BSL2 to BSL4 containment was established here. The use of this method by many other laboratories is expected to confirm its potential usefulness as a much needed gold standard to ensure the lack of mycoplasma contamination in every cell culture usage from research in cell biology (1, 3, 29, 30) and virology (31) to clinical use of living cells (grafts with heterologous or autologous cells modified and amplified in vitro (such as in vitro matured and antigen loaded self-dendritic cells and progenitors expressing a therapeutic gene) or cell derived products such as vaccines, therapeutic antibodies, growth factors and cytokines, oncolytic viruses, viral vectors for gene delivery (32, 33), see OIE regulations (http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/1.01.07_TESTS_FOR_STERILITY.pdf) United States Pharmacopoeia 63 Regulation (http://assets.sial.com/deepweb/assets/bioreliance/marketing/documents/pdf/h/r/bioreliance_pdfs/O0660810USP63WhitePaperFHR/O0660810USP63WhitePaperFHR.pdf) and European Medicines Agency recommendations (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500140352.pdf).

The authors declare no competing interests

Author contributions:

BB and DG designed the research. AJ, IG and BB, designed and/or contributed new reagents and performed research, AJ, BB, OA and DG analysed data. Every author drafted or revised the manuscript, and they all approved the final version.

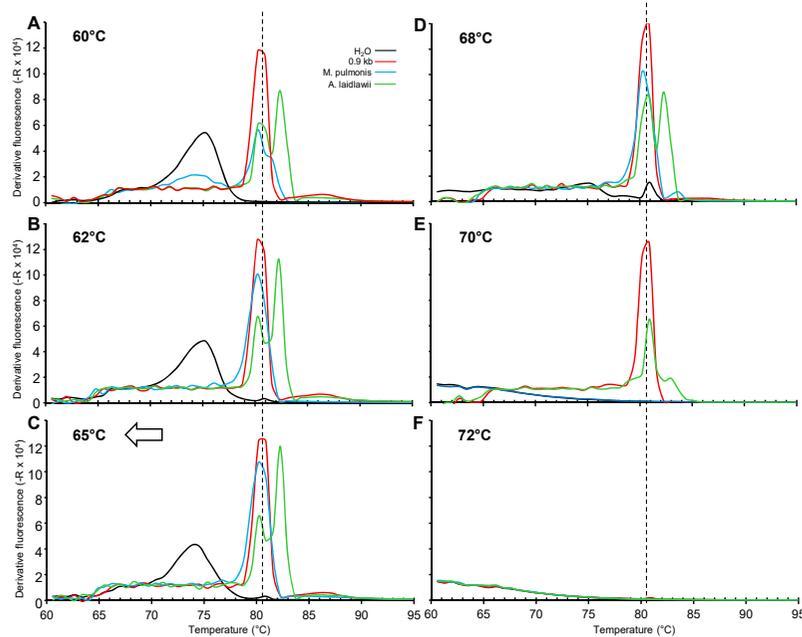
Acknowledgements: This work was supported by a two-year grant from the Infrastructure BIOBANQUES (INSERM US013) and IBISA (AAP2013) to CelluloNet BioBank, BB-0033-00072 (DG). The authors thank the following people for their commitment in providing virus stocks, cell supernatant or bacteria and plants samples and/or performing tests requiring BSL3 or BSL4 containment: C. PEREIRA, J. BRUNEL, C. MATHIEU (CIRI team "Immunobiology of Viral Infections"), Y. BENITO, L. BERAUD, (CIRI team "Staphylococcal Pathogenesis"), O. REYNARD, (CIRI team "Molecular Basis of Viral Pathogenicity"), S. ALAIS, (CIRI team "Retroviral Oncogenesis"), H. GRUFFAT, (CIRI team "Oncogenic Herpesviruses"), D. DECIMO (CIRI team "Eukaryotic and Viral Translation") J. HOFFMANN, M. MOROSO, M. MILENKOV, (CIRI team "Emerging Pathogens Laboratory", Fondation Mérieux), L. LINES, I. PILA-CASTELLANOS (CIRI team "Cell Biology of Viral Infections"), S. REYNARD (CIRI team "Unit of Biology of Emerging Viral Infections", Institut Pasteur), V. BARATEAU, (CIRI team "Host-Pathogen Interaction during Lentiviral Infection"), E. DECEMBRE (CIRI team "Vesicular trafficking, innate response and viruses"), F. FAURE (CIRI team « Innate Immunity in Infectious and Autoimmune Diseases »), F. GUIGUEN, Christophe TERZIAN (INRA, UMR 754, RPC team "Infection and Endogenous Retroviruses"), S. MELY, D PANNETIER (Laboratoire P4 Jean Mérieux, INSERM, US3), and Nicolas SAUVION (INRA BGPI, Montpellier).. The authors also thank R. CATTANEO and P. DEVAUX for providing us with useful plasmid reagent, Xavier FOISSAC for helpful discussions, and acknowledge the support of the Measles virus BioBank BB-0033-00053 facility and the BSL3-ANIRA facility of the SFR BioSciences, INSERM, CNRS, UMS3444/US8. Philip Lawrence is also thanked for English language revision.

References

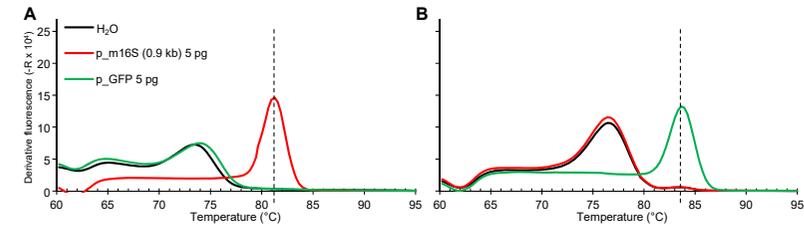
1. **Olaserin-George, A. O., and J. B. Hogenesch.** 2015. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res* **43**:2535-2542.
2. **Drexler, H. G., and C. C. Uphoff.** 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* **39**:75-90.
3. **Young, L., J. Sung, G. Stacey, and J. R. Masters.** 2010. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nat Protoc* **5**:929-934.
4. **Salling, H. K., and S. R. Bang-Christensen.** 2016. Multi-primer qPCR assay capable of highly efficient and specific detection of the vast majority of all known Mycoplasma. *Biologicals* **44**:129-138.
5. **Johansson, K. E., M. U. Heldtander, and B. Pettersson.** 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods Mol Biol* **104**:145-165.
6. **Carey, T. E., T. Takahashi, L. A. Resnick, H. F. Oettgen, and L. J. Old.** 1976. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:3278-3282.
7. **Yasumura, Y., and M. Kawakita.** 1963. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho* **21**:1201-1219.
8. **Cohen, M. M., C. C. Huang, and H. F. Clark.** 1967. The somatic chromosomes of 3 lizard species: Gekko gekko, Iguana iguana, and Crotophytus collaris. *Experientia* **23**:769-771.
9. **McBurney, M. W., and B. J. Rogers.** 1982. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* **89**:503-508.
10. **Puck, T. T., S. J. Cieciura, and A. Robinson.** 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* **108**:945-956.
11. **Devaux, P., and R. Cattaneo.** 2004. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* **78**:11632-11640.
12. **Tomkowiak, M., R. Ghittoni, M. Teixeira, B. Blanquier, J. Szecsi, D. Negre, D. Aubert, C. A. Coupet, M. Brunner, E. Verhoeyen, J. L. Thoumas, F. L. Cosset, Y. Leverrier, and J. Marvel.** 2013. Generation of transgenic mice expressing EGFP protein fused to NP68 MHC class I epitope using lentivirus vectors. *Genesis* **51**:193-200.
13. **Bustin, S. A.** 2010. Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods* **50**:217-226.
14. **Taylor, S. C., and E. M. Mrkusich.** 2014. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). *J Mol Microbiol Biotechnol* **24**:46-52.
15. **Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**:611-622.
16. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
17. **Drum, D. E., and J. S. Christopoulos.** 1972. Hepatic scintigraphy in clinical decision making. *J Nucl Med* **13**:908-915.
18. **Altman, D. G., and J. M. Bland.** 1994. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *Brmj* **308**:1552.
19. **Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. Glockner.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:D590-596.
20. **Li, H., J. Chen, M. Zhou, X. Geng, J. Yu, W. Wang, X. E. Zhang, and H. Wei.** 2014. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and pyrazinamide susceptibility related to pncA mutations in sputum specimens through an integrated gene-to-protein function approach. *J Clin Microbiol* **52**:260-267.
21. **Huang, L., X. Hu, M. Zhou, Y. Yang, J. Qiao, D. Wang, J. Yu, Z. Cui, Z. Zhang, X. E. Zhang, and H. Wei.** 2014. Rapid detection of New Delhi metallo-beta-lactamase gene and variants coding for carbapenemases with different activities by use of a PCR-based in vitro protein expression method. *J Clin Microbiol* **52**:1947-1953.
22. **Beaman, K. D., and J. D. Pollack.** 1981. Adenylate energy charge in *Acholeplasma laidlawii*. *J Bacteriol* **146**:1055-1058.
23. **Peredeltchouk, M., S. A. David, B. Bhattacharya, D. V. Volokhov, and V. Chizhikov.** 2011. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J Appl Microbiol* **110**:54-60.
24. **DaMassa, A. J., J. G. Tully, D. L. Rose, D. Pitcher, R. H. Leach, and G. S. Cottew.** 1994. Mycoplasma auris sp. nov., Mycoplasma cottewii sp. nov., and Mycoplasma yeatsii sp. nov., new sterol-requiring mollicutes from the external ear canals of goats. *Int J Syst Bacteriol* **44**:479-484.
25. **Jimena, O. N., J. M. Laura, M. M. Elena, N. H. Alonso, and Q. M. Teresa.** 2009. Association of Raillietia caprae with the presence of Mycoplasmas in the external ear canal of goats. *Prev Vet Med* **92**:150-153.
26. **Lysnyansky, I., M. Freed, R. S. Rosales, I. Mikula, N. Khateb, I. Gerchman, M. van Straten, and S. Levisohn.** 2016. An overview of Mycoplasma bovis mastitis in Israel (2004-2014). *Vet J* **207**:180-183.

27. **Boonyayatra, S., L. K. Fox, J. M. Gay, A. Sawant, and T. E. Besser.** 2012. Discrimination between Mycoplasma and Acholeplasma species of bovine origin using digitonin disc diffusion assay, nisin disc diffusion assay, and conventional polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* **24**:7-13.
28. **Calcutt, M. J., B. Szikriszt, A. Poti, J. Molnar, J. Z. Gervai, G. E. Tusnady, M. F. Foecking, and D. Szuts.** 2015. Genome Sequence Analysis of Mycoplasma sp. HU2014, Isolated from Tissue Culture. *Genome Announc* **3**.
29. **Uphoff, C. C., and H. G. Drexler.** 2014. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol* **106**:28.24.21-14.
30. **Alves, M. P., C. P. Carrasco, C. Balmelli, N. Ruggli, K. C. McCullough, and A. Summerfield.** 2007. Mycoplasma contamination and viral immunomodulatory activity: dendritic cells open Pandora's box. *Immunol Lett* **110**:101-109.
31. **Baronti, C., B. Pastorino, R. Charrel, and X. de Lamballerie.** 2013. Mycoplasma removal: simple curative methods for viral supernatants. *J Virol Methods* **187**:234-237.
32. **Wilder, C. N., and Y. Reid.** 2015. Mycoplasma Quality Control of Cell Substrates and Biopharmaceuticals. *Am. Pharm. Rev.* **18**:<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/181806-Mycoplasma-Quality-Control-of-Cell-Substrates-and-Biopharmaceuticals/>.
33. **Sampath, R., L. B. Blyn, and D. J. Ecker.** 2010. Rapid molecular assays for microbial contaminant monitoring in the bioprocess industry. *PDA J Pharm Sci Technol* **64**:458-464.

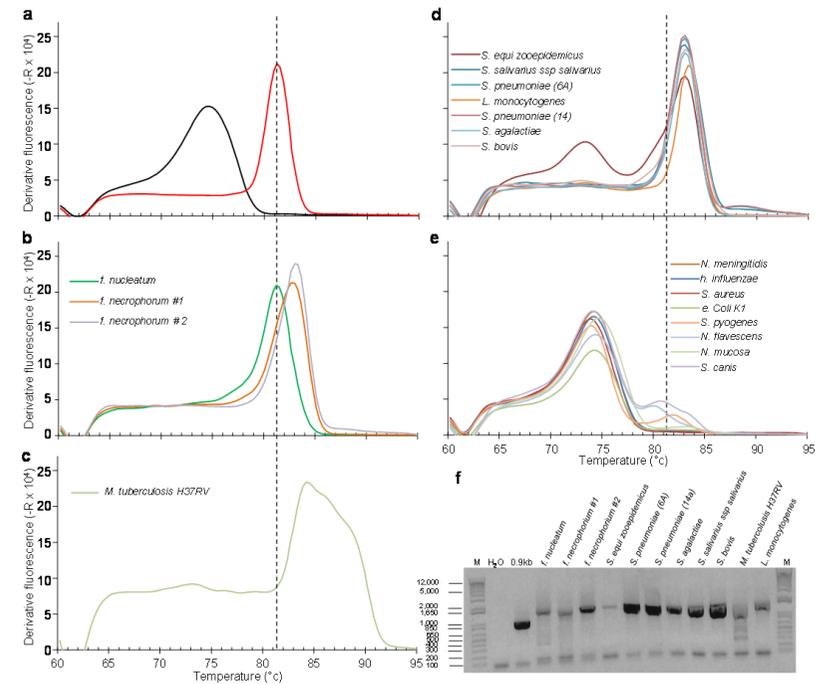
Supplementary information.



S1 Fig. Optimisation of elongation temperature during m16S qPCR of p_m16S(0.9kb), *A. laidlawii* and *M. pulmonis* DNA. *Tm* peak of 16S rDNA amplicon is indicated by the dotted line on each graph.



S2 Fig. Specificity of the m16S_qPCR (a) and GFP_qPCR (b) when tested on the p_GFP DNA loading probe and p_m16S(0.9kb) reference.



S3 Fig. m16S qPCR detects a subset of bacteria in addition to *Mollicutes* with p_m16S(0.9kb) and water (a), detected (b-d) and non-detected (e) bacteria with amplicons sizes from panels a-d (f). *Tm* peak of 16S rDNA amplicon is indicated by the dotted line on each graph.

JX079429	'Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;DA111;'	3811611
KC208619	'Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Mitochondria;'	4206231
AY506529	'Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rickettsiales;Mitochondria;'	373834
BX660417	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Alcaligenaceae;'	457922
CP000440	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Burkholderiaceae;'	461983
JX402118	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Burkholderiaceae;'	3872576
KF441693	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;'	4502570
DD145970	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Hydrogenophiales;Oxalobacteraceae;'	498730
FR733701	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Methylophilales;Hydrogenophilaceae;'	1296901
AM167944	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Methylobacillus;'	278135
AT280846	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Gallionellaceae;'	205730
X74913	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Nitrosomonadaceae;uncultured;'	4953751
JG684443	'Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Rhodocyclales;Rhodocyclaceae;'	3728461
Y17712	'Bacteria;Proteobacteria;Beta proteobacteria;TR3-20;'	4958909
ABC50100069	'Bacteria;Proteobacteria;Delta proteobacteria;Desulfuromonadales;Desulfuromonadaceae;Malomonomas;'	183861
JO956670	'Bacteria;Proteobacteria;Delta proteobacteria;Mycococcales;Nannocystaceae;Plesiocystis;'	3793440
CP008849	'Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Syntrophobacterales;Syntrophobacteraceae;uncultured;'	464754
G0478257	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Alteromonadales;Alteromonas;'	1514956
JP979361	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteraceae;Enterobacter;'	3133519
A8086227	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Oceanospirillales;Halomonadaceae;Chromohalobacter;'	12686
JN082536	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Moraxellaceae;Acinetobacter;'	3164581
DQ3350823	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;'	529655
DQ234142	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Thiotrichales;Francisellaceae;Francisella;'	511501
AB066228	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Thiotrichales;Piscirickettsiaceae;Cycloclasticus;'	12687
AF442740	'Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;'	221802
AB476706	'Bacteria;Spirochaetales;Spirochaetales;Spirochaetales;Leptospiraceae;'	59115
EF583633	'Bacteria;Spirochaetales;Spirochaetales;Spirochaetales;Spirochaetales;Treponema;'	716871
AF069287	'Bacteria;Synergistetes;Synergistia;Synergistales;Synergistaceae;'	192553
CP008796	'Bacteria;Thermodesulfobacteria;Thermodesulfobacteriales;Thermodesulfobacteriaceae;'	464733
AY878719	'Bacteria;Thermotogae;Thermotogae;Thermotogales;Thermotogaceae;'	420845
AF234711	'Bacteria;Verrucomicrobia;OPB35 soil group;'	203145

BIBLIOGRAPHIE

- Weisburg, W. G. *et al.* A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171**, 6455–6467 (1989).
- Chastel C. Edmon Nocard (1850-1903) and the centenary of the discovery of the first mycoplasma (1898). *Histoire des Sciences Médicales* **Tome XXXIII**, 311–315 (1999).
- Callaway, E. Contamination hits cell work. *Nature* 511, 518–518 (2014).
- Larerin-George, A. O. & Hogenesch, J. B. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *bioRxiv* 007054 (2014). doi:10.1101/007054
- Chazel, M., Tardy, F., Le Grand, D., Calavas, D. & Poumarat, F. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Veterinary Research* **6**, 32 (2010).
- Garnier, M. *et al.* Mycoplasmas, plants, insect vectors : a matrimonial triangle. *C. r. Acad. sci., Sér. 3 Sci. vie* **324**, 923–928 (2001).
- Minguzzi, S., Terlizzi, F., Lanzoni, C., Pollini, C. P. & Ratti, C. A Rapid Protocol of Crude RNA/DNA Extraction for RT-qPCR Detection and Quantification of a Candidatus Phytoplasma prunorum'. *PLOS ONE* **11**, e0146515 (2016).
- Störmer, M., Vollmer, T., Henrich, B., Kleesiek, K. & Dreier, J. Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 291–300 (2009).
- Geraghty, R. J. *et al.* Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* **111**, 1021–1046 (2014).
- Young, L., Sung, J., Stacey, G. & Masters, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature Protocols* **5**, 929–934 (2010).
- Johansson, K.-E., Heldtander, M. U. K. & Pettersson, B. in *Mycoplasma Protocols* (eds. Miles, R. & Nicholas, R.) 145–165 (Humana Press, 1998).
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**, e45–e45 (2001).
- Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622 (2009).
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- Jean A., Tardy, F., Allatif O., Grosjean I., Blanquier B. & Gerlier D. Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes. *PLoS ONE* **12**(2), e0172358 (2017).
- Devaux, P. & Cattaneo, R. Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* **78**, 11632–11640 (2004).
- Drexler, H. G. & Uphoff, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* **39**, 75–90 (2002).
- Geraghty, R. J. *et al.* Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br. J. Cancer* **111**, 1021–1046 (2014).
- Uphoff, C. C. & Drexler, H. G. Eradication of Mycoplasma contaminations from cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol* **106**, 28.5.1-12 (2014).