

## Des outils moléculaires pour diagnostiquer l'état microbiologique du sol

Les indicateurs microbiens de l'état microbiologique des sols :  
Biomasse Moléculaire Microbienne, Empreinte Moléculaire  
des communautés, Diversité Taxonomique microbienne

Plateforme GenoSol – INRA de Dijon



### POURQUOI LES MICROORGANISMES DU SOL ?

Dans le sol, les microorganismes représentent la **majorité des organismes vivants** et sont **les plus diversifiés taxonomiquement et fonctionnellement** (Torvisk et Øvreås, 2002). Il en résulte que le sol est considéré aujourd'hui

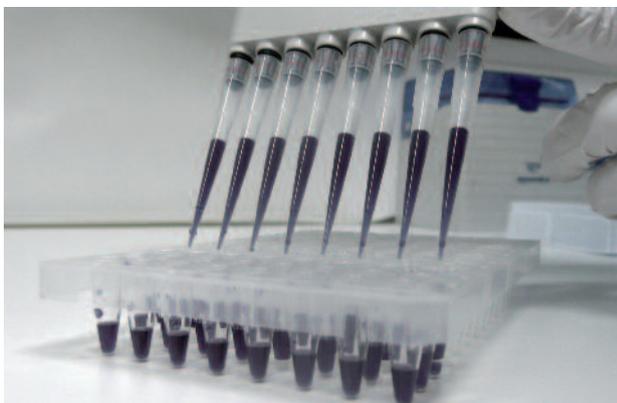
#### Pour 1g de sol

De 1 à 10 milliard(s) de bactéries,  
de plusieurs 10<sup>aines</sup> à 100<sup>aines</sup>  
de milliers d'espèces bactériennes  
et jusqu'à 200 m d'hyphes fongiques.

comme **le réservoir de diversité biologique et génétique** de la planète. Ces microorganismes jouent un **rôle fondamental** dans la **structure du sol** (stabilité des agrégats et de la porosité) et participent activement à l'ensemble des cycles biogéochimiques rendant ainsi un **ensemble de services écosystémiques** indispensables au développement et bien être des sociétés humaines : cycles des nutriments (carbone et azote), fertilité biologique via la transformation des matières organiques, productivité des

plantes, dégradation des polluants, etc... De plus, de par leurs caractéristiques génétiques et physiologiques, les microorganismes du sol sont **susceptibles d'intégrer et de s'adapter aux pressions (perturbations) environnementales** (anthropiques ou naturelles) que subit le sol. Ils apparaissent ainsi comme **des bio-indicateurs pertinents, précoces et sensibles de l'évolution des sols** (Ranjard *et al.*, 2010).

### L'ADN DU SOL AU SERVICE DE L'ÉVALUATION DE L'ÉTAT BIOLOGIQUE DU SOL



Les récents développements des approches moléculaires pour la caractérisation robuste des communautés microbiennes des sols permettent **d'accéder à une biodiversité jusque là méconnue**. Ces méthodes reposent exclusivement sur **l'extraction et l'analyse de l'ADN des organismes microbiens** du sol. Elles ont levé les verrous liés aux méthodes classiques dites pasteurienne qui ne permettaient l'observation et la caractérisation que d'une part restreinte de la diversité microbienne des sols (moins de 5% des microorganismes sont cultivables au laboratoire sur milieu nutritif).

#### Le saviez vous ?

Les indicateurs moléculaires peuvent être mesurés sur des **échantillons congelés et conservés pendant plusieurs années**, cela constitue la **mémoire de l'évolution d'un sol**.

L'**optimisation** et la **standardisation** de ces outils a permis le développement de **3 indicateurs moléculaires microbiens** permettant de faire l'évaluation environnementale :

- **Indicateur Biomasse Moléculaire Microbienne** qui correspond à une estimation de l'abondance en microorganismes. C'est une bonne alternative à la mesure de la biomasse microbienne par la méthode de fumigation/extraction (Marstorp *et al.*, 2000 et Widmer *et al.*, 2006) de par sa facilité de mise en œuvre et la possibilité d'application en moyen débit qui lui confèrent des avantages techniques et pratiques,
- **Indicateur Empreinte Moléculaire des communautés microbiennes (bactéries et champignons)** basé sur la technique de génotypage la plus résolutive (ARISA) permettant une détection sensible d'une modification (présence/absence, intensité) des populations microbiennes,
- **Indicateur Diversité Taxonomique microbienne** permettant de faire un inventaire précis et exhaustif des espèces présentes en lien avec leur rôle écologique (fertilité, pathogènes, symbiotes, etc...). Cet indicateur s'appuie sur une technique de séquençage massif de l'ADN : le pyroséquençage.

*Ces indicateurs et des exemples d'application sont détaillés dans les fiches dédiées jointes.*

## PLATEFORME GENOSOL : UNE STRUCTURE LOGISTIQUE ET TECHNIQUE POUR LA STANDARDISATION ET LE TRANSFERT DE BIOINDICATEURS MICROBIENS ET DES RÉFÉRENTIELS ASSOCIÉS

En 2008, l'INRA de Dijon a créé la plateforme GenoSol pour répondre à **des besoins scientifiques mais aussi opérationnels** (Ranjard *et al.*, 2009). Cette plateforme est hébergée au sein de l'UMR Agroécologie et ses activités s'organisent en 3 services :

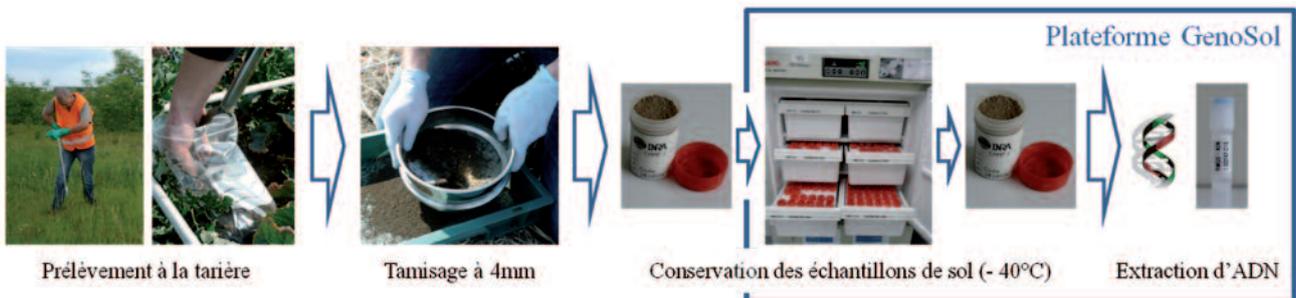
- un **Centre de Ressources Génétiques** (CRG) national sur les sols (unique en Europe) qui a pour but de **stocker et conserver les ressources génétiques (ADN)** et de les mettre à disposition de la communauté scientifique. Les échantillons de sols conservés proviennent en majorité de **réseaux de surveillance** de sols (RMQS, IGCS Massif Central, etc...), **d'Observatoires de Recherche en Environnement** (SOERE ACBB, PRO, ANDRA), de **sites expérimentaux pérennes** (LTO Eu, réseau PIC, site de Fény, réseau ADEME, sites CETIOM et Arvalis, sites CA 21, 71), et de **réseaux d'exploitation agricole** (réseau OSV),
- une **Plateforme Technique** permettant le **développement et la veille technologique** sur les méthodes d'extraction des ADN des sols et les outils de caractérisation des ressources génétiques microbiennes (pyroséquençage, métagénome, métagénomique, mesure d'activité, etc...). Cette plateforme permet d'**améliorer la standardisation des procédures et des outils moléculaires** avec des objectifs de normalisation (AFNOR et ISO) et le **transfert de ces bioindicateurs de l'état microbiologique des sols**,
- un **Système d'Information Environnementale** (SIE) centré sur le développement de la base de données «-MicroSol database®-» qui permet d'une part de **gérer le CRG et la traçabilité** de ses échantillons et, d'autre part de stocker et d'analyser les données de caractérisation génétique des sols (taxonomique, fonctionnelle). La base de données permet d'**élaborer un véritable référentiel d'interprétation et de traduction de la diversité microbienne** des sols qui servira à définir la **gamme de variations** de la biodiversité des sols.



## COMMENT RÉALISER LES PRÉLEVEMENTS DE SOL POUR LES INDICATEURS MOLÉCULAIRES ?

Le prélèvement des échantillons de sol est une étape clé de la mesure des bioindicateurs. Il peut être **effectué par les gestionnaires de site ou les exploitants** au moyen d'une tarière. La stratégie d'échantillonnage s'appuie sur l'expertise de la plateforme GenoSol et le prélèvement correspond en un échantillon composite de **5 coups de tarière représentatifs** de la zone à caractériser (placette, parcelle, maille d'un quadrillage, etc...) selon une procédure standardisée. Les échantillons doivent être **conservés au froid** (glacière, 4°C mais non congelés) et **tamisés à 4 mm** (procédure standardisée) avant d'être envoyés à la plateforme GenoSol pour être mis en **conservatoire à -40°C**.

La plateforme GenoSol réalise ensuite l'extraction d'ADN selon un protocole standardisé correspondant à l'optimisation de la norme ISO-TC-90-SC4-WG4N119 (Dequiedt *et al.*, 2011).

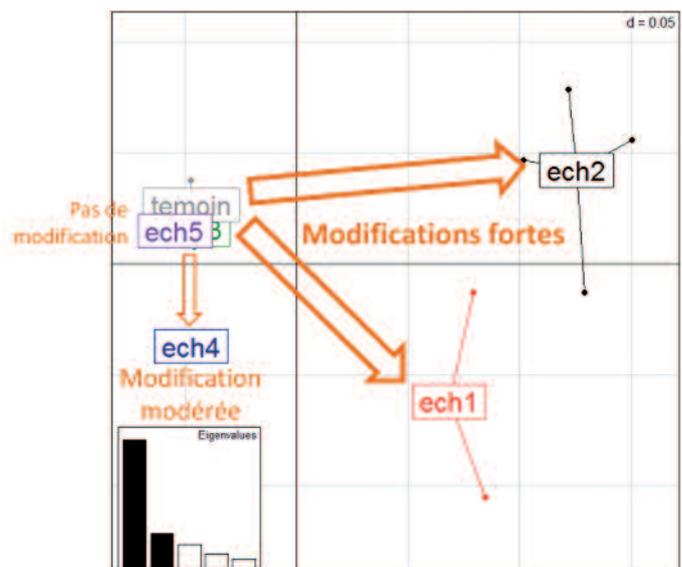
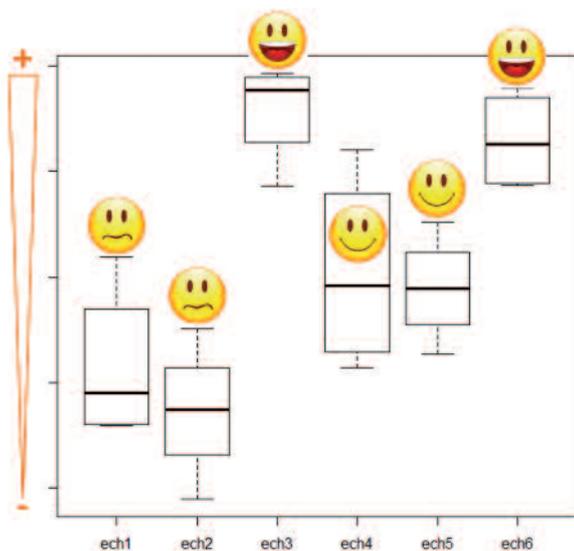


## COMMENT INTERPRÉTER LES RÉSULTATS DES INDICATEURS MOLÉCULAIRES MICROBIENS ?

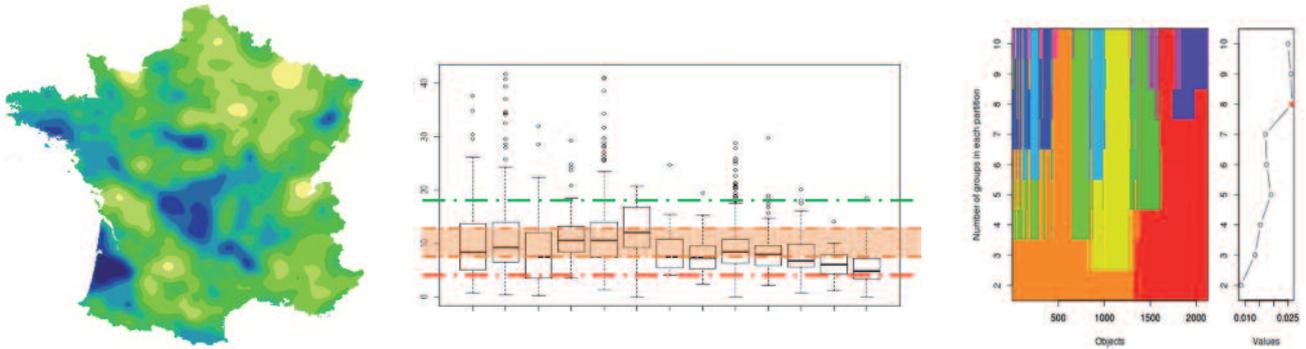
La réalisation technique pour la mesure des indicateurs moléculaires est réalisée par un technicien spécialisé selon des protocoles standardisés et optimisés au sein de la plateforme GenoSol.

L'interprétation des résultats se fait grâce à l'expertise des scientifiques de la plateforme GenoSol suivant **2 méthodes en fonction des situations** :

- **Comparaison de modalités (échantillon témoin ou de référence)** : l'évaluation environnementale et le diagnostic sont réalisés par comparaison et classement des différentes modalités (parcelles, placettes) entre elles *via* l'utilisation d'outils mathématiques et d'analyse adaptés,



- Interprétation par positionnement dans le référentiel (MicroSol database<sup>®</sup>)** : le référentiel d'interprétation de la plateforme GenoSol est en cours de finalisation. Il est basé sur **l'accumulation des mesures sur l'ensemble des dispositifs nationaux et internationaux** dans le cadre de programmes de recherche. Il s'appuie notamment sur la totalité des sols du RMQS (Gis-Sol<sup>®</sup> - 2 200 échantillons) **représentatifs de la variabilité des types de sol et de climat** rencontrée à l'échelle du territoire national et des dispositifs expérimentaux permettant d'affiner les conclusions sur des questionnements plus précis (travail du sol, itinéraires techniques, rotations, amendements organiques, etc...). Ce référentiel permet de définir les **gammes de variation des indicateurs** en évaluant la part des perturbations naturelles sur la part des perturbations dues aux activités humaines et de conclure sur l'impact des actions de l'homme sur l'état et le fonctionnement biologique du sol.



Représentations graphiques des analyses mathématiques du référentiel d'interprétation (cartographie, gamme de variations, arbres de régression, etc...)



## BIBLIOGRAPHIE

- Ranjard L., Dequiedt S., Lelievre M., Maron P.A., Mougél C., Morin F., Lemanceau P., 2009 - Platform GenoSol: a new tool for conserving and exploring soil microbial diversity. *Environmental Microbiology Report*, 1: pp 97-99.
- Ranjard L., Dequiedt S., Jolivet C., Saby N.P.A., Thioulouse J., Harmand J., Loisel P., Rapaport A., Fall S., Simonet P., Joffre R., Chemidlin-Prevost-Bouré N., Maron P.A., Mougél C., Martin M.P., Toutain B., Arrouays D., Lemanceau P., 2010 - Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing French national initiative. *Agronomy for Sustainable Development*, 30 : pp 359-365.
- Rillig M.C., Mummey D.L., 2006 - Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171 : pp 41-53.
- Torsvik V., Øvreås L., 2002 - Microbial diversity and function in soil : from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5 : pp 240-245.
- Widmer F., Rasche F., Hartmann M. & Fliessbach A., 2006 - Community structure and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOKlongtermfieldexperiment. *Applied Soil Ecology*, 33 : pp 294-307.

## CONTACTS

Plateforme GenoSol - INRA de Dijon  
 17 rue de Sully - BP 86510  
 21065 Dijon Cedex France  
[http://www.dijon.inra.fr/plateforme\\_genosol](http://www.dijon.inra.fr/plateforme_genosol)

**RANJARD Lionel (Dir. Scientifique)**  
 Tel : +33 (0) 3 80 69 30 88  
[lionel.ranjard@dijon.inra.fr](mailto:lionel.ranjard@dijon.inra.fr)

**DEQUIEDT Samuel (Dir. Technique)**  
 Tel : +33 (0) 3 80 69 33 83  
[samuel.dequiedt@dijon.inra.fr](mailto:samuel.dequiedt@dijon.inra.fr)