



GenoSol
PLATEFORME



http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol

Le séquençage massif pour caractériser la diversité microbienne des sols: standardisation et applications au sein de la plateforme GenoSol.

Sébastien Terrat
UMR 1347 Agroécologie,
Plateforme GenoSol
INRA – Université de Bourgogne- AgroSup
DIJON, France





Background

➤ Soil is a natural environment sustaining multiple functions

Biomass and food production



Source : A. Richer de Forges (CA 45)

Source : Infosol (INRA Orléans)

Source of raw material



Source : J. Moulin (CA 36)

Life support



Source : Infosol (INRA Orléans)

➤ Microbial communities in soils are very abundant and highly diverse

Bacteria

1g of soil



$10^6 - 10^9$ individuals

$10^3 - 10^6$ species

Fungi



$10^3 - 10^6$ individuals

Variable

Tools for molecular ecology available in GenoSol

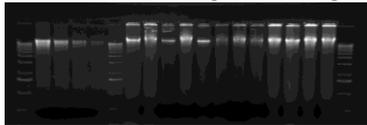
Soil



DNA

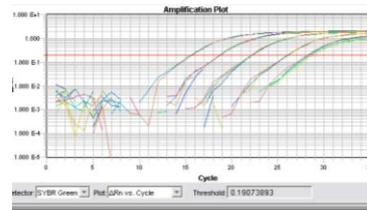


Soil DNA quantity



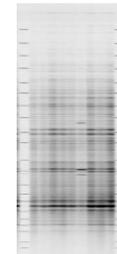
Molecular microbial biomass

qPCR 16S/18S rDNA



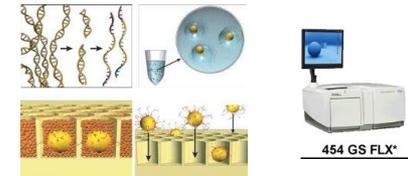
Bacterial density
Fungal density

Genotyping



Genetic structure

NGS



Taxonomic inventory
Diversity indices

Abundance and Density

Composition and Diversity



Contexte scientifique : Ecologie Microbienne du sol

Fronts de recherche : Caractériser la biodiversité microbienne des sols
Abondance, Inventaire, Distribution et Régulation



Faire le lien entre **diversité des communautés microbiennes**
et le fonctionnement biologique du sol – **services écosystémiques**



- ✓ Depuis 20 ans : **développement exponentiel des outils de biologie moléculaire**
- ✓ Manque de **standardisation des techniques** (absence de normalisation)
- ✓ Manque de **Référentiels d'interprétation**
- ✓ Manque d'**intégration des échelles vastes** (spatiales et temporelles)



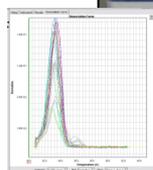
Manque de généralité des résultats obtenus
Retard dans la normalisation des outils

Les Services GenoSol



Conservatoire des Ressources Génétiques Sol

Stoker et gérer les ADN de sols

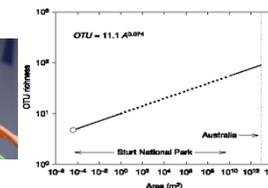
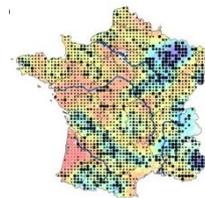
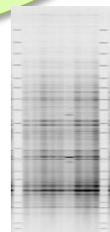
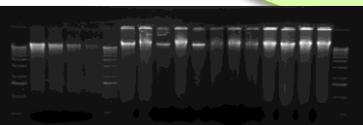


Plateforme Technique

Caractérisation moléculaire (densité, diversité)
des communautés microbiennes des sols

Système d'Information Environnementale

(référentiel sur l'abondance et la diversité
des communautés microbiennes des sols)





Les enjeux scientifiques et techniques de GenoSol

Techniques

- ✓ Développer et **standardiser des outils de caractérisation** moléculaire
- ✓ Développer des **outils d'analyse mathématique, bioinformatique**
- ✓ Mettre en place des **référentiels d'interprétation** de la biodiversité microbienne

Scientifiques

- ✓ **Ecologie descriptive** : décrire et comprendre la diversité microbienne des sols (distribution, régulation, déterminisme)
- ✓ **Ecologie fonctionnelle** : lien diversité – fonction/services
- ✓ **Ecologie de conservation** : protéger ce patrimoine
- ✓ **Ecologie prédictive** : anticiper les changements

Veille technologique



Sol



ADN



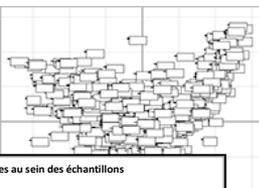
Amplicons



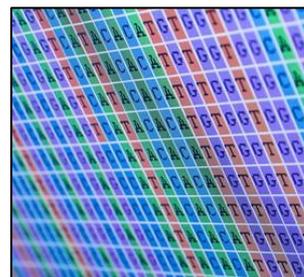
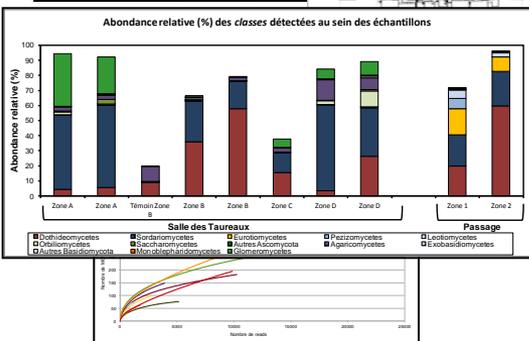
Multiplexage



| CLUSTERII | | |
|---------------|---------|----------|
| Sample | Nb_seqs | Nb_clust |
| Zone A | 1770 | 62 |
| Zone A | 2739 | 100 |
| Témoin Zone B | 5163 | 76 |
| Zone B | 20159 | 310 |
| Zone B | 10274 | 183 |



| Simpson | 1/Simpson |
|-----------|-----------|
| 0.25854 | 3.868 |
| 0.206566 | 4.841 |
| 0.496192 | 2.015 |
| 0.0867775 | 11.524 |
| 0.231748 | 4.315 |



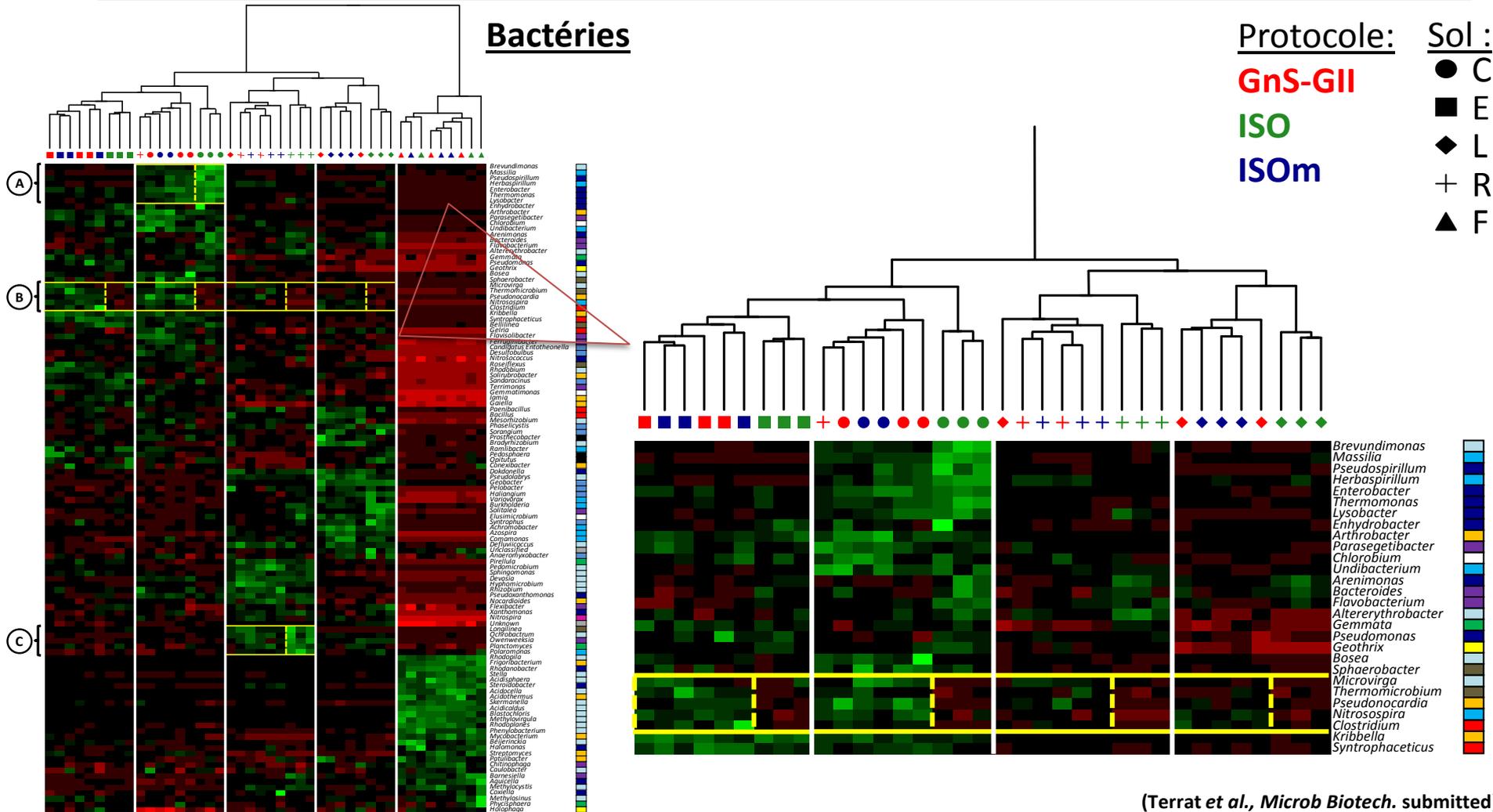
Stabilisation technique vis-à-vis des inventaires microbiens nécessaire !

Veille technologique : procédures d'extraction

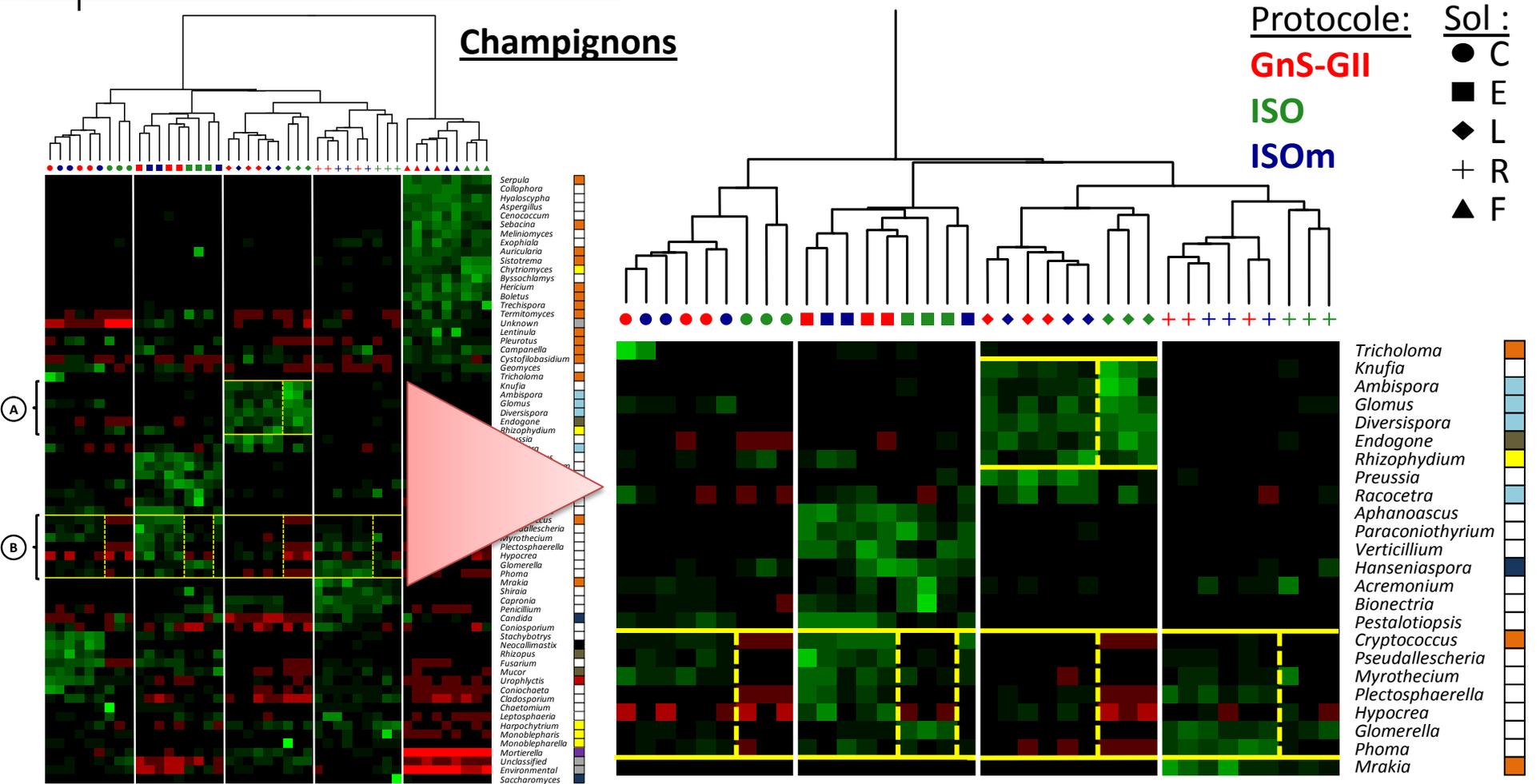


Influence des procédures d'extraction

✓ 1^{er} paramètre à prendre en compte dans les inventaires taxonomiques de la microflore tellurique.



Veille technologique : procédures d'extraction



✓ **Forte influence** des **procédures d'extraction** utilisées en fonction des sols et des groupes microbiens étudiés (Bilan : ISOm = GnS-GII > ISO).

✓ **Procédure ISOm** semble plus efficace pour la **détection des microorganismes** (champignons, spores, etc...).

(Terrat et al., Microb Biotech. submitted)

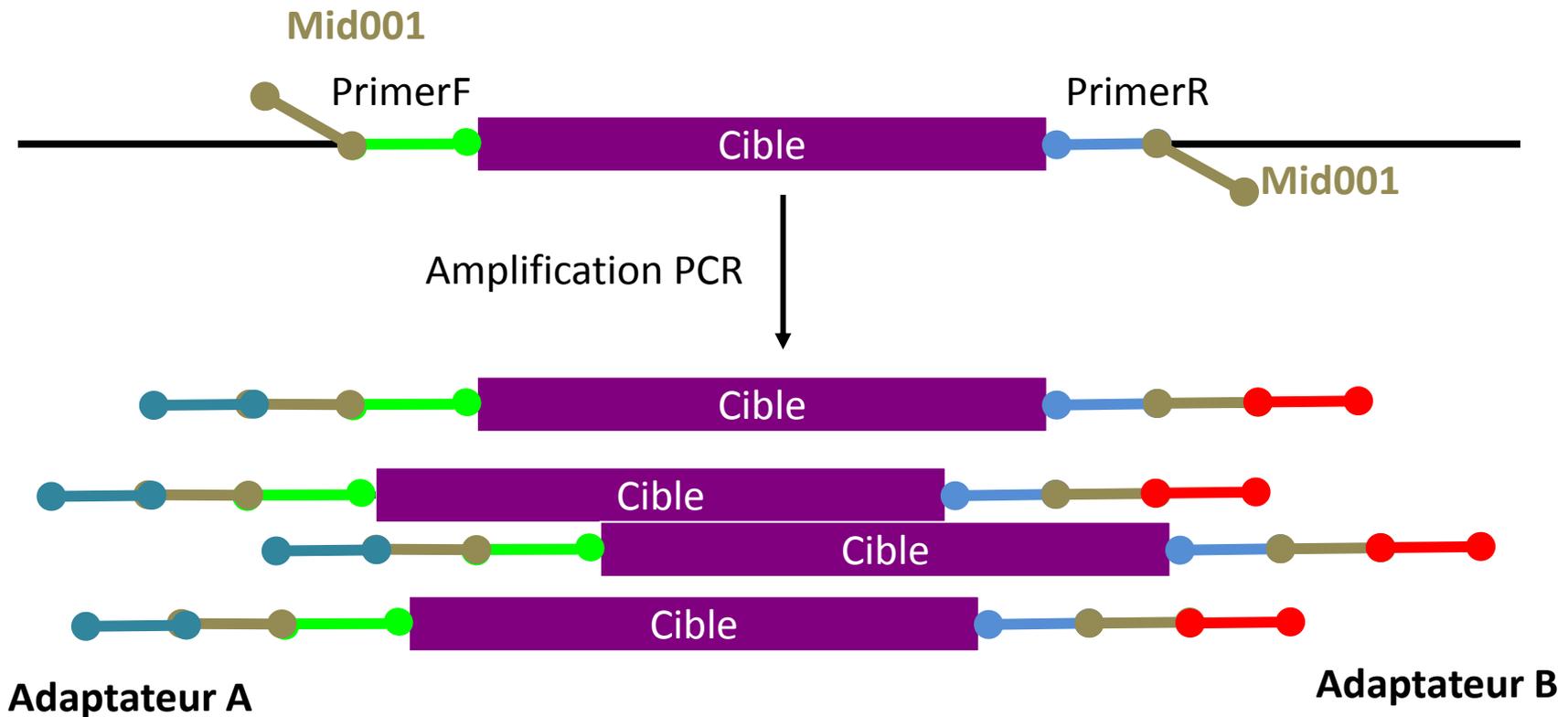
Veille technologique : Influence du multiplexage

Partenariat scientifique



Influence du multiplexage des échantillons et de la ligation

✓ **Paramètre** à considérer pour éviter de biaiser les inventaires taxonomiques obtenus.



Veille technologique : Influence du multiplexage



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche



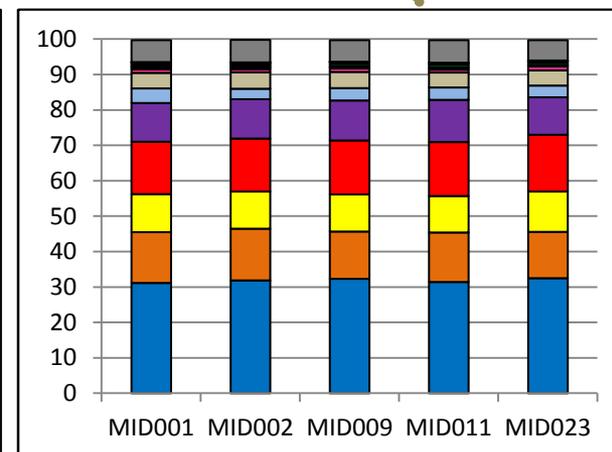
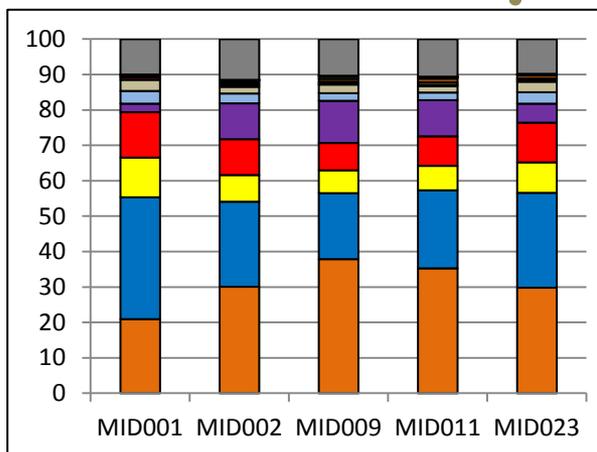
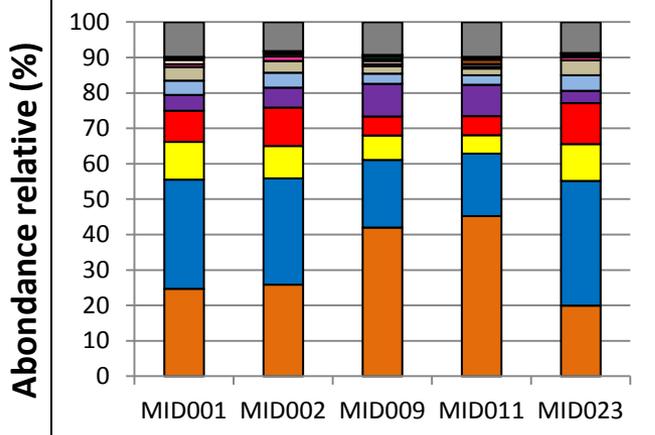
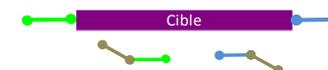
Ajout des **MIDs** et
Adaptateurs par PCR



Ajout des **MIDs** par PCR,
Adaptateurs par ligation



Ajout des **MIDs** par 2 PCRs,
adaptateurs par ligation



MID associé au sol étudié (LUSIGNAN)



- ✓ Forte influence des **MIDs** et **Adaptateurs** lors de leur ajout par une étape PCR directe sur la représentativité des communautés MAIS la **Nested-PCR** permet de fortement diminuer leur impact .
- ✓ L'étape de **ligation** (kits « General » ou « Rapid ») entraîne également un **biais important** sur la composition des communautés détectées.

Veille technologique : Profondeur de séquençage



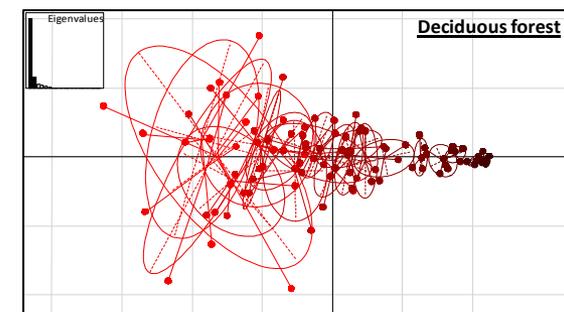
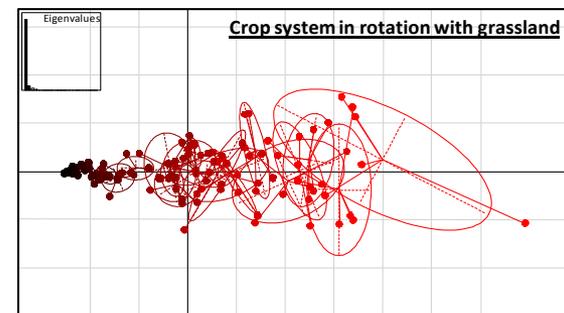
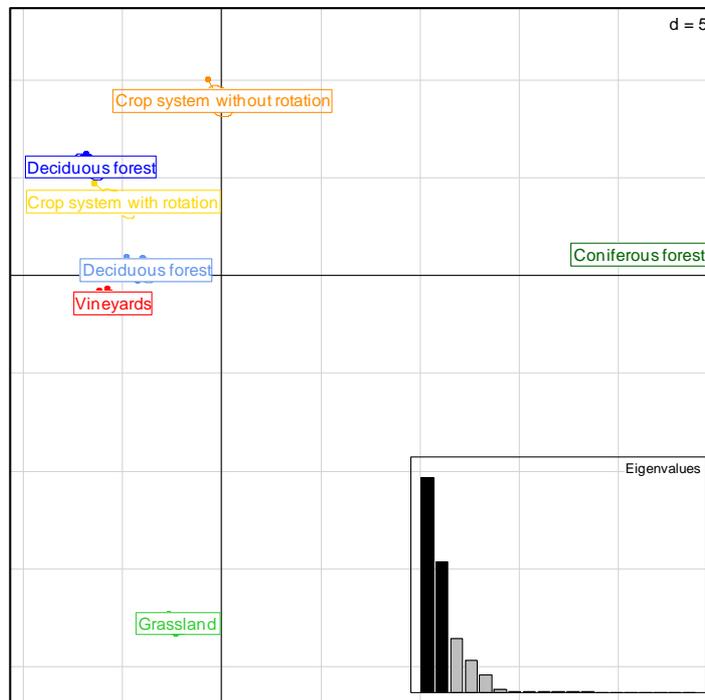
Profondeur de séquençage

✓ **Combien de reads** sont nécessaires pour avoir une bonne représentativité des communautés.

Partenariat scientifique => obtention de plus de 2 M de reads bruts pour la totalité des sols

Analyses ACP réalisés pour chaque sol analysé, et sur des sous-jeux de données bioinformatiques au niveau du phylum (5 réplicats sur chaque sol et chaque sous-jeu).

Sols analysés : sols sous culture, forêt à feuilles caduques, forêt de conifères, prairies, vignes.

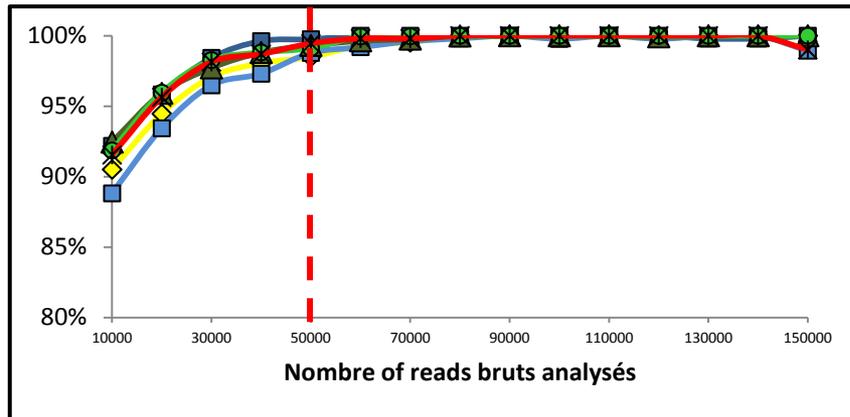


10 50 100 150 350 600
(Milliers de reads bruts)

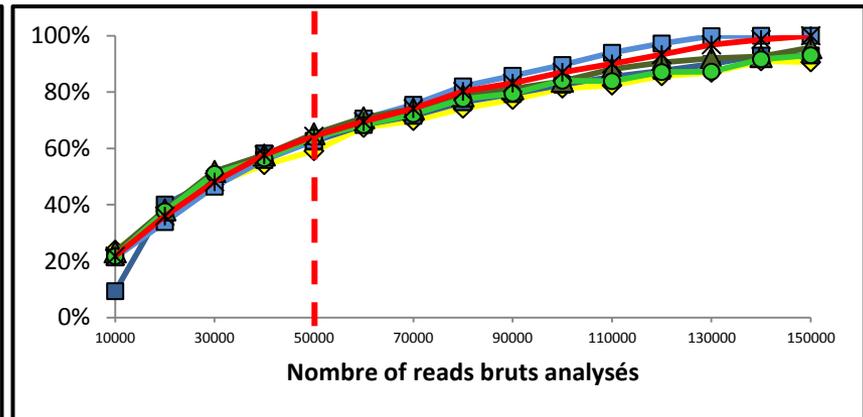
Veille technologique : Profondeur de séquençage



Pourcentage d'OTUs
détectés communs (%).



OTUs majoritaires



OTUs minoritaires

- ✓ **10 000 reads bruts** sont suffisants pour **comparer des sols** entre eux sur la base des communautés microbiennes détectées.
- ✓ **Cependant**, pour obtenir un **bon aperçu** des communautés des sols, particulièrement avec des analyses indépendantes de la taxonomie, un minimum de **50 000 reads bruts** est nécessaire.
- ✓ Ceci est particulièrement vrai pour l'étude d'**organismes rares**, mis en évidence **aléatoirement** au sein des jeux de données.



Veille technologique : Conclusions

Connaissance et maîtrise des biais potentiels

- ✓ Procédures d'extraction, Amplification PCRs, Multiplexage, Ligation, ...
- ✓ Disposition en local d'un séquenceur **454 GS JUNIOR** pour veille technologique, optimisation de protocoles.

Recul scientifique et technique sur la technologie de pyroséquençage

- ✓ **Profondeur de séquençage**, Mock communities, etc...
- ✓ Mise en place de **procédures spécifiques standardisées** pour l'analyse des communautés microbiennes par **pyroséquençage**.

Production massive de données

- ✓ Nécessité d'utiliser un **pipeline d'analyse** efficace, convivial, facile d'utilisation et de paramétrage.



Applications et apports du pyroséquencage pour différentes études en microbiologie environnementale.

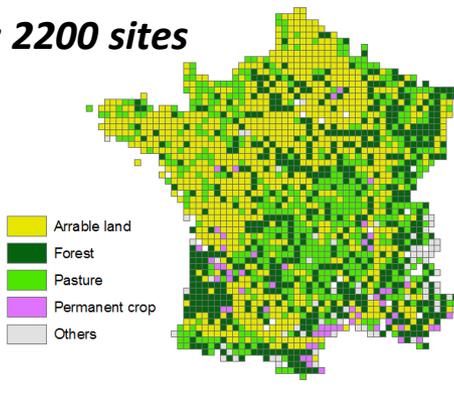


Une initiative française et structurante : ECOMIC-RMQS

RMQS : Réseau de Mesure de la Qualité des Sols, mis en place en 2002 (INRA INFOSOL, Orléans, partenaire 2), grille d'échantillonnage des sols français : 16 kmx16km sur toute la France ⇒ 2200 sites



RMQS : 2200 sites



Déterminisme pop. microbiennes selon conditions env. ?

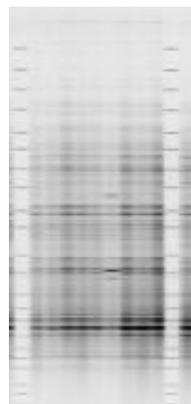


ECOMIC-RMQS

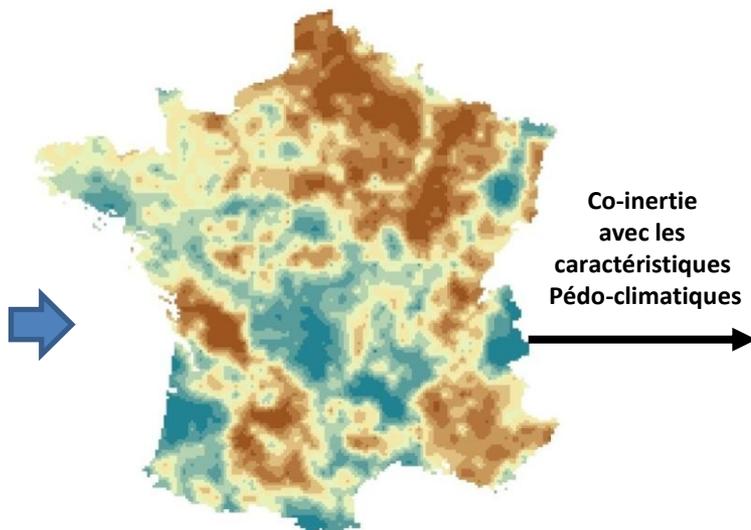
Prise en compte de la composante microbienne (abondance et diversité)

- (i) quantifier et référencer la biodiversité des sols français,
- (ii) **définir sa distribution spatiale** à l'échelle du territoire,
- (iii) comprendre **la régulation** et les évolutions de **la biodiversité des sols** sous différentes pressions environnementales.

Profils biogéographiques des communautés microbiennes

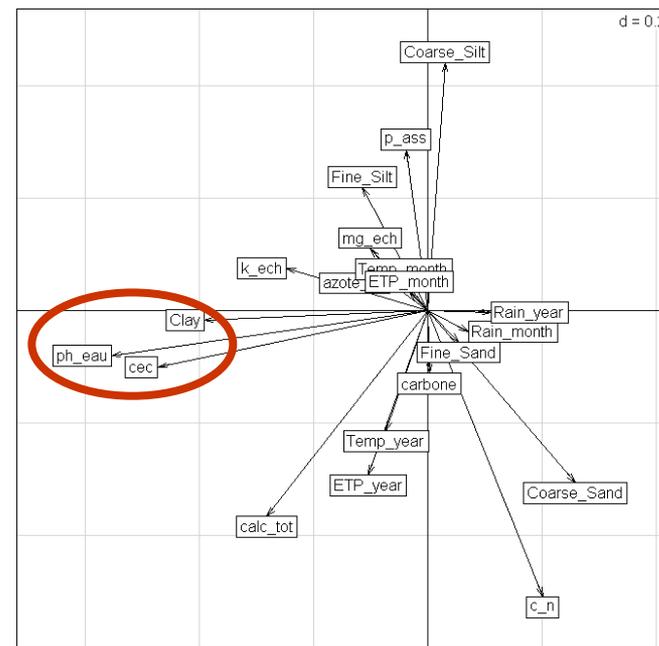


Génotypage
par ARISA



Co-inertie
avec les
caractéristiques
Pédo-climatiques

Cartographie nationale des variations
de structure génétique des communautés
bactériennes



- **Opposition entre régions** → **Différences** régionales en terme **de composition**
- **Structures spatiales** → **Régions écologiques** présentant une plus ou moins forte variabilité ("diversité")

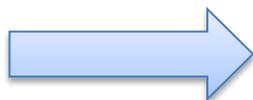
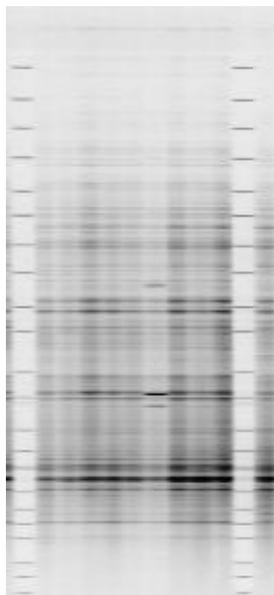
pH et texture sont les paramètres les plus structurants
Importance du type de sol, peu d'influence du climat



Classement des régions selon
leur biodiversité microbienne régionale
Sud-Est > Nord > Bretagne > Landes

Du génotypage au séquençage haut-débit

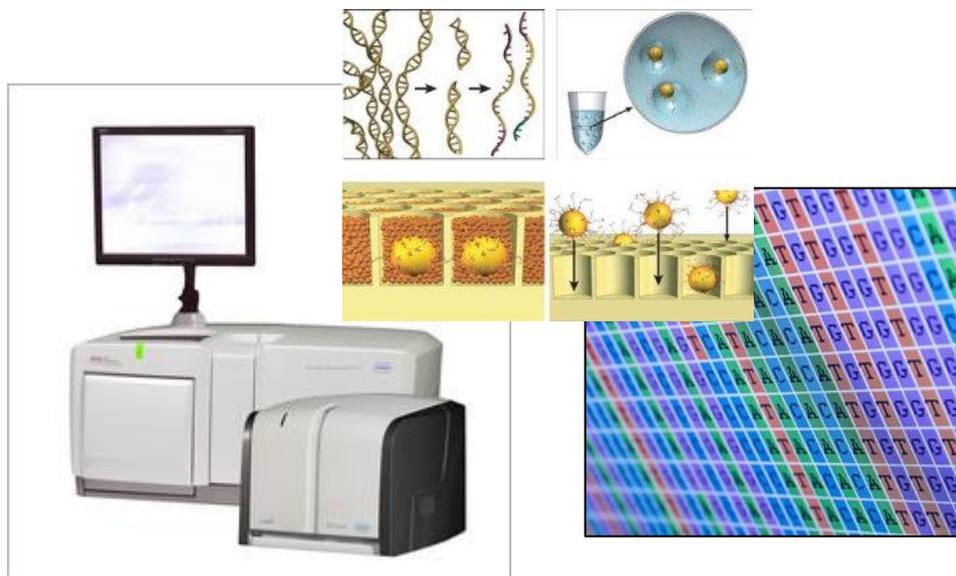
Profil de génotypage



Structure génétique



Séquençage haut débit - Pyroséquençage



Inventaire taxonomique

(plusieurs 10^{aines} de milliers esp / sols)



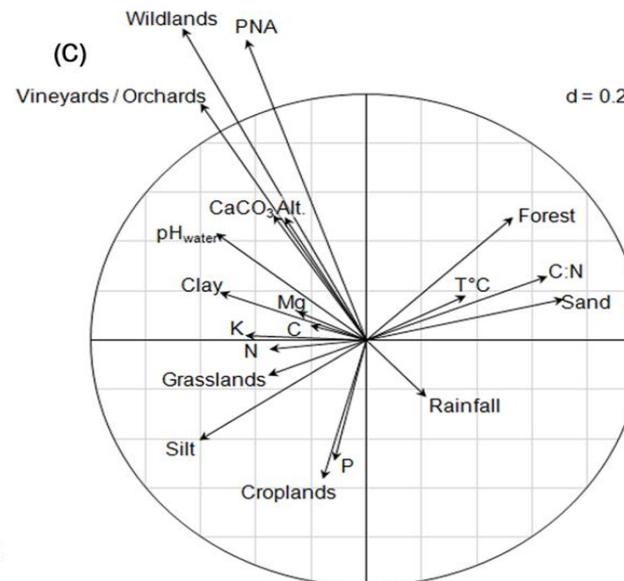
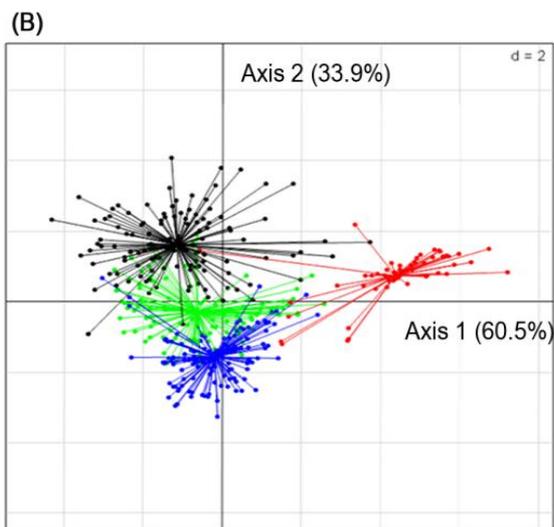
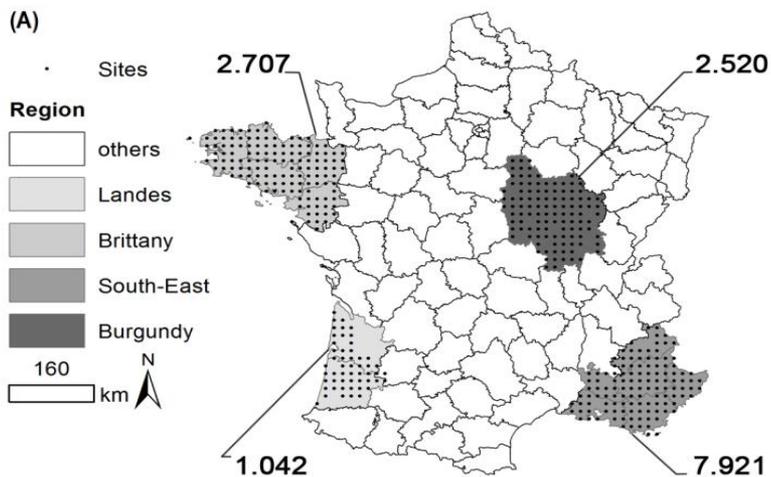
Vraie estimation de la diversité

Identification de populations d'intérêts agro-écologique
(pathogènes, impliqués dans fertilisation...)

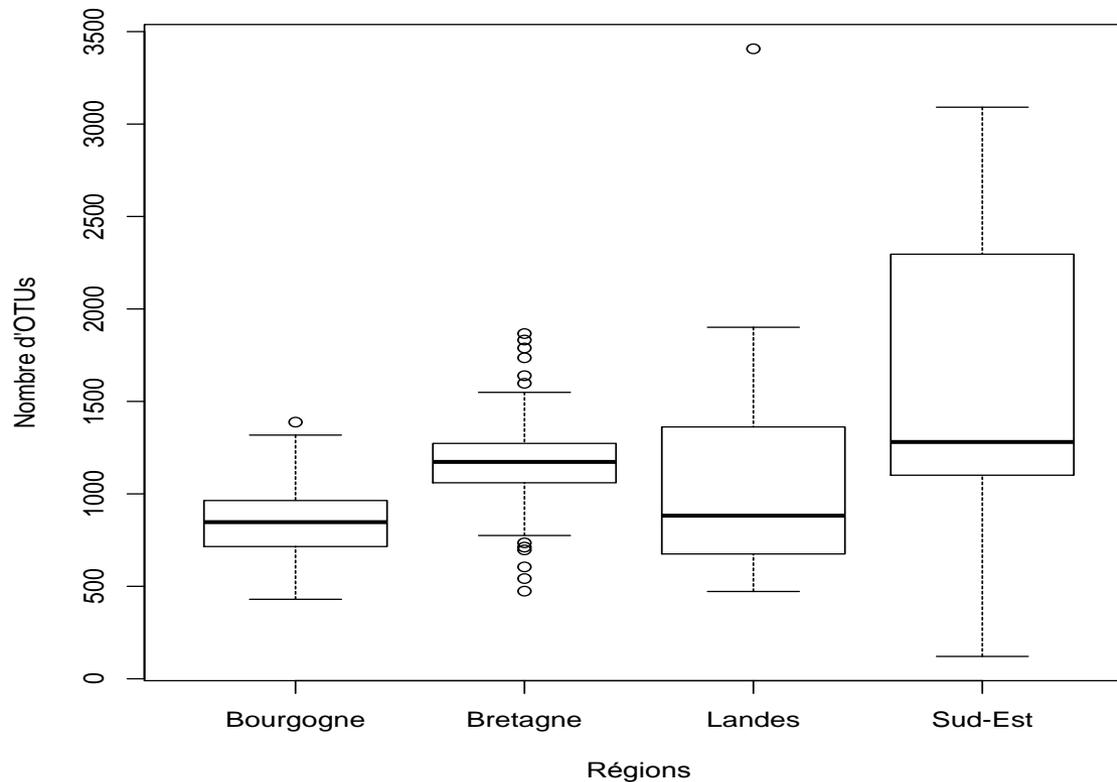
MetaTAXOMIC-RMQS

2013 : Quatre régions

2014 : Toute la France



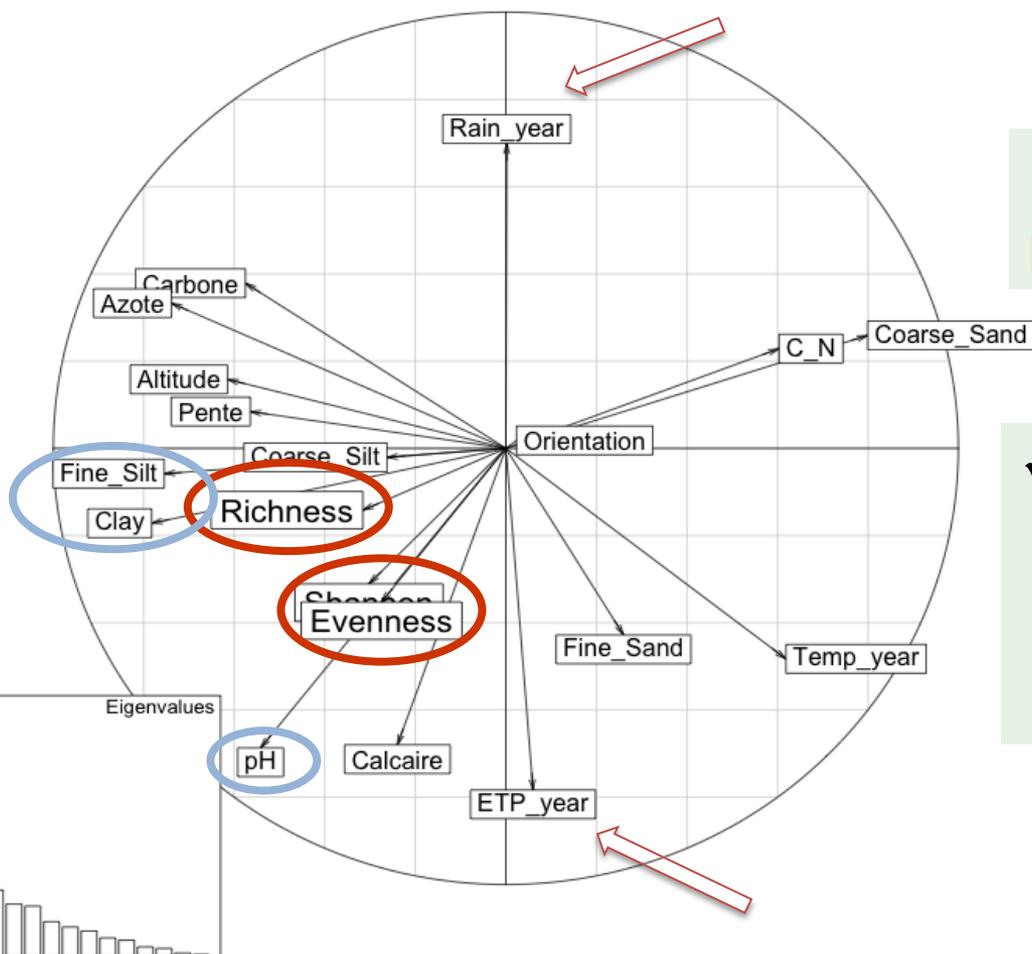
MetaTAXOMIC-RMQS



Richesse taxonomique bactérienne des sols dans les quatre régions

Sud est >> Bretagne > Bourgogne ≥ Landes

Lien avec les paramètres de l'environnement



✓ Peu d'influence des paramètres climatiques

✓ Importance du type de sol
Richesse semble liée plus à la texture du sol,
Diversité, quant à elle, plus reliée au pH du sol.

Perspectives scientifiques (diversité, référentiel, fonctions...)

➔ **Changement d'échelle** : Quels filtres à quelle échelle?



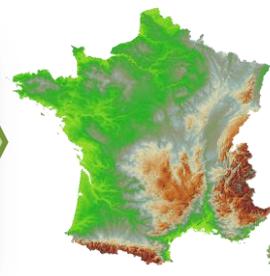
μ-habitat
(thèse de F. Constancias)



Parcelle
(OREs, réseau PIC, sites ADEME, OSV,...)



Paysage
(Zone Atelier Fenay, OPE ANDRA, IGCS Massif Central, ...)

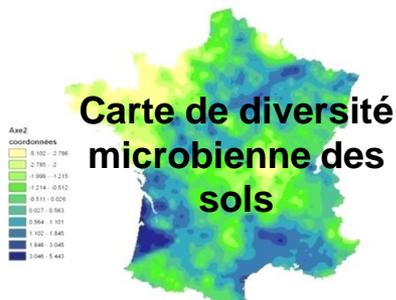


Territoire national
(RMQS)



Continent
(LTO Ecofinders, LUCAS soils)

➔ **Faire de vrais inventaires taxonomiques et faire le lien avec le fonctionnement du sol** : Pyroséquençage vs Turnover des matières organiques des sols - cycle du Carbone



Traduction



Programme Carbomic-RMQS



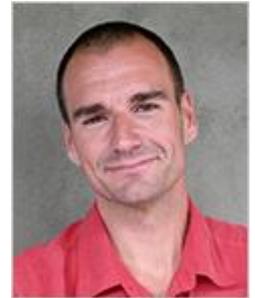
Merci de votre attention ...



Acknowledgments



Pierre-Alain Maron



Lionel Ranjard



Fabien Morin



Philippe Lemenceau



Samuel Dequiedt



Mélanie Lelièvre



Patrick Wincker