

Vers une optimisation de la procédure d'extraction d'ADN des sols pour caractériser la diversité microbienne tellurique par le pyroséquençage des gènes ribosomiques

Pierre PLASSART (1,2), pierre.plassart@dijon.inra.fr, Sébastien TERRAT (2), Mélanie LELIEVRE (2), Tiffanie REGNIER (2), Samuel DEQUIEDT (2), Bruce THOMSON (3), Robert GRIFFITHS (3), Mark BAILEY (3), Christophe MOUGEL (1,2), Philippe LEMANCEAU (1), Lionel RANJARD (1,2).
 (1) UMR 1347 INRA Agroécologie, Dijon, France; (2) Plateforme GenoSol, UMR 1347 INRA Agroécologie, Dijon, France; (3) CEH, Wallingford, Oxfordshire, UK.

Introduction

Depuis plusieurs années, les communautés microbiennes du sol sont étudiées au travers de leur ADN. Le mode d'extraction de l'ADN du sol revêt donc une importance capitale pour décrire la biodiversité microbienne. A ce jour, de nombreuses procédures d'extraction d'ADN des sols sont disponibles et certaines sont même standardisées (norme ISO 11063). Ces différentes techniques sont généralement basées sur une étape de lyse physique et de lyse chimique et sont surtout adaptées aux outils moléculaires de type qPCR et empreintes moléculaires. Le développement récent des techniques de séquençage massif parallèle (pyroséquençage 454), qui permettent d'aborder des inventaires taxonomiques précis et représentatifs, nous conduit à revisiter les biais associés à ces procédures d'extraction d'ADN. L'objectif de cette étude est de définir le protocole d'extraction d'ADN du sol le plus approprié pour accéder au maximum de diversité microbienne tellurique.

Procédures expérimentales

3 procédures d'extraction d'ADN testées sur 5 sols

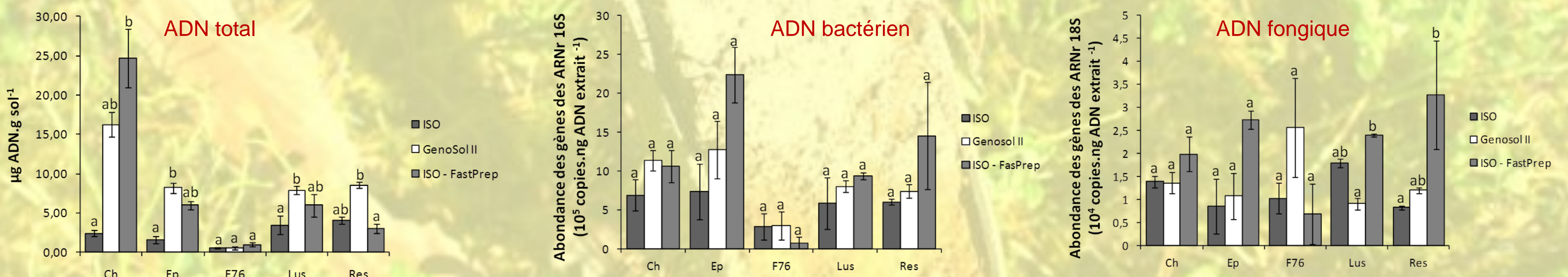
	ISO	Genosol II (FastPrep)	ISO + broyage FastPrep
sol	1g	1g	1g
matrice billes	billes verre 106µm	4g	-
	billes verre 2mm	8	-
	billes céramique 1,4mm	-	2,5g
	billes verre 8mm	-	4
	billes silice 100µm	-	2g
tampon de lyse	tampon lyse 1 *	4ml	4ml
	tampon lyse 2 *	-	-
broyage	bead beating	1600rpm, 30 sec	-
	fastprep	-	3*30sec à 4m/sec
lyse chimique	bain-marie à 70°C	10 min	2*15min
récupération du surageant	Centrifugation	1 min, 14000g	5 min, 7000g
	Déprotéinisation (sur 1ml de surageant)	Acétate de K pH5,5	100µl
Précipitation ADN	incubation dans la glace	10 min	10 min
	Centrifugation	5 min, 14000g	5 min, 14000g
	isopropanol à -20°C	900µl	900µl
	incubation -20°C	15 min	30min
	centrifugation	30min, 14000g	30 min, 13000rpm
	ethanol 70 à -20°C	400µl	400µl
	centrifugation	15 min, 14000g	5 min, 13000rpm
	séchage culot	15 min, 37°C	15 à 25 min, 50°C
	suspension adn (eau UP)	100µl	100µl
	* tampon lyse 1	100ml 1M Tris-HCl (pH 8), 200ml 0,5M EDTA (pH8), 100ml 1M NaCl, 50ml 20% PVP 40, 100ml 20% SDS, 450ml eau UP	
* tampon lyse 2	100ml 1M Tris-HCl (pH 8), 200ml 0,5M EDTA (pH8), 100ml 1M NaCl, 100ml 20% SDS, 500ml eau UP		

Sol	Site expérimental	Occupation du sol	Argiles	Limons fins	Limons grossiers	Sables fins	Sables grossiers	C organique	N total	C/N	Calcaire	pH
Ch	Champdrotre Site agricole	Culture	504	180	145	73	98	24.9	2.8	9	102	7.7
Ep	Bretenières Site expérimental INRA La Mailleye sur Seine	Culture	392	320	228	34	26	16.5	1.65	10	2	7.0
F76	Site observatoire ADEME	Forêt	101	167	205	217	310	103.3	3.1	34	>1	3.8
Lus	Lusignan Site expérimental INRA Pierrelaye	Prairie	175	369	304	73	79	13.2	1.33	9.92	>1	6.6
Res	Site expérimental agricole	Culture	79	66	44	315	496	50.2	2.16	23.3	22	7.5

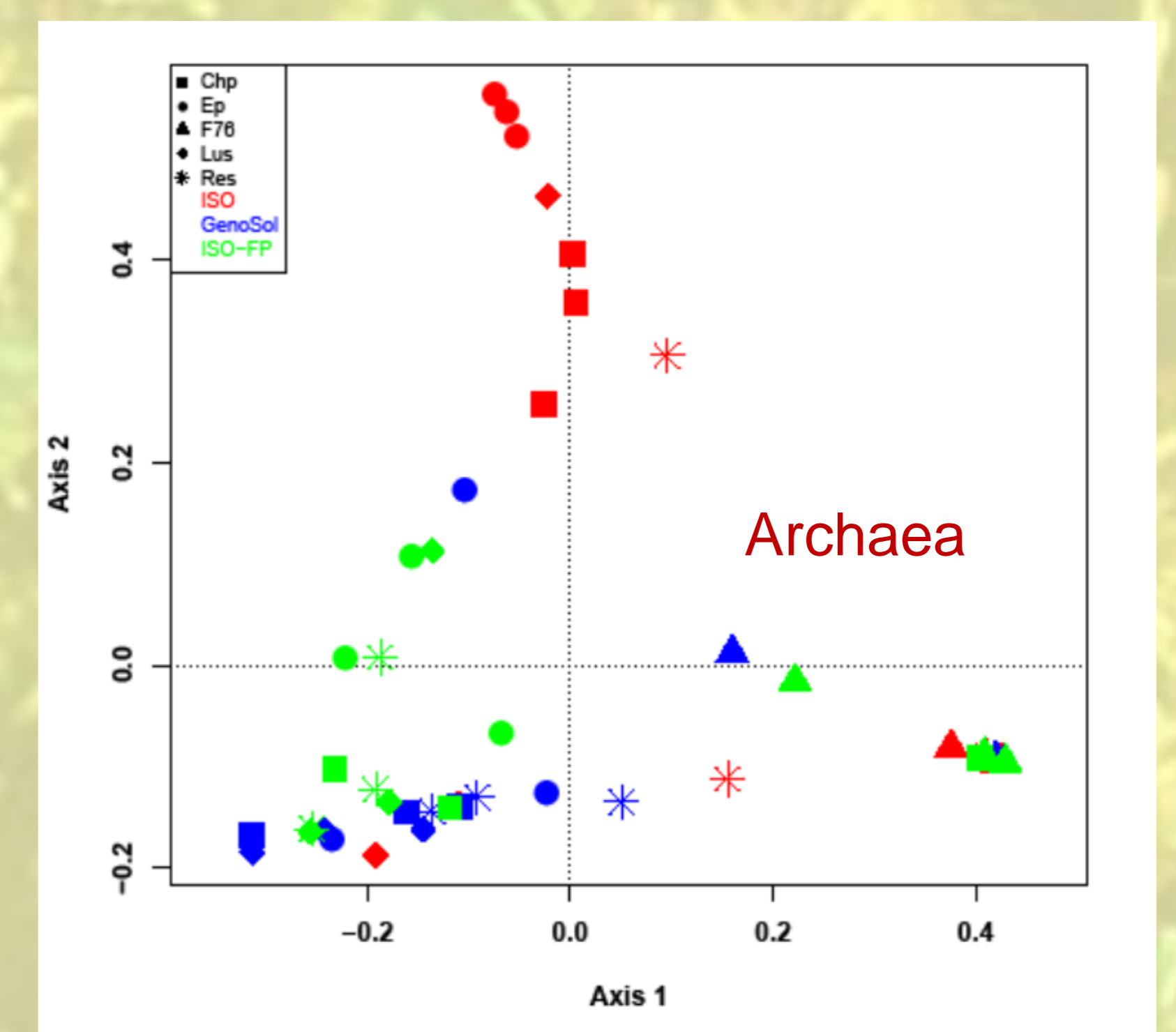
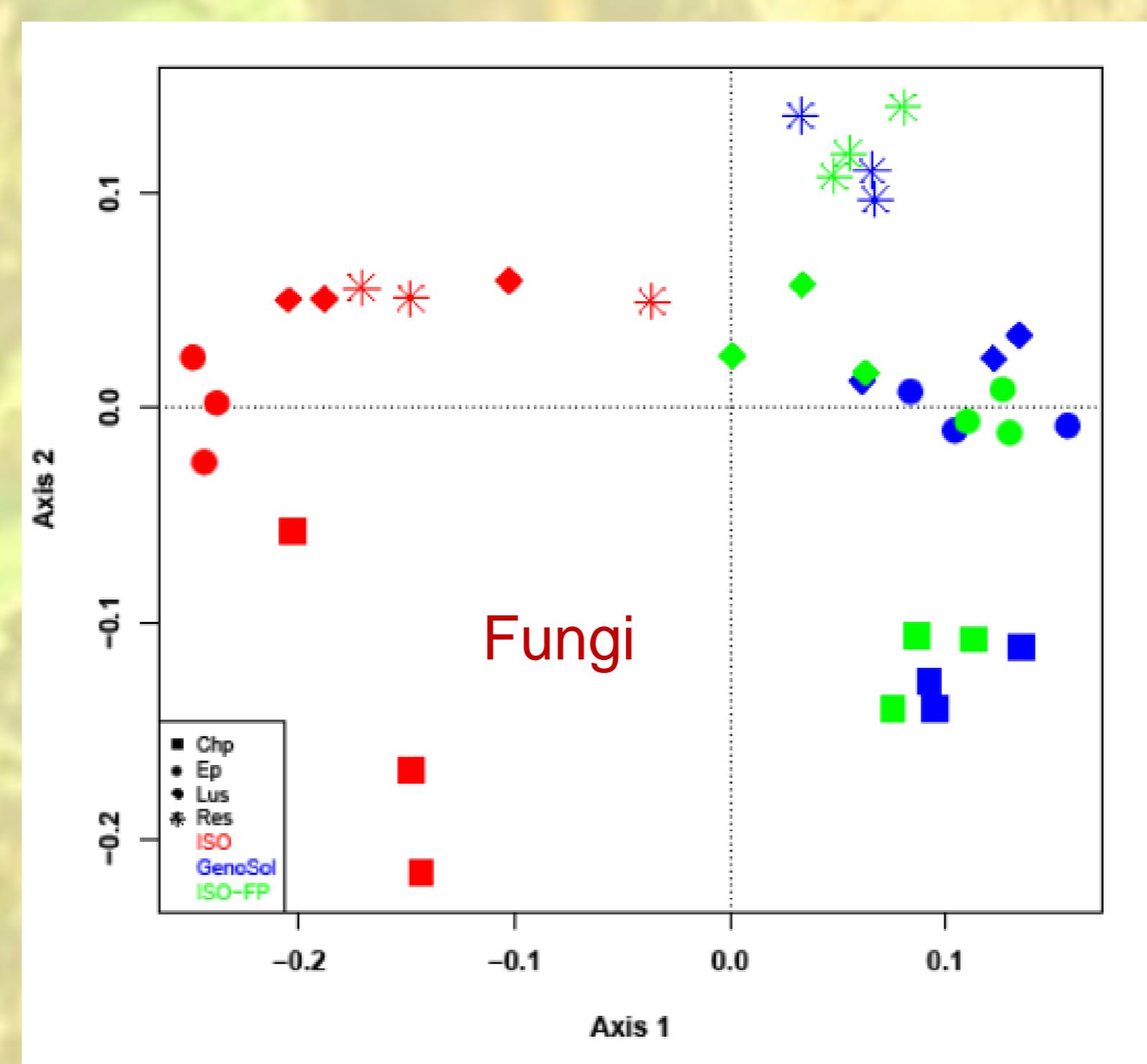
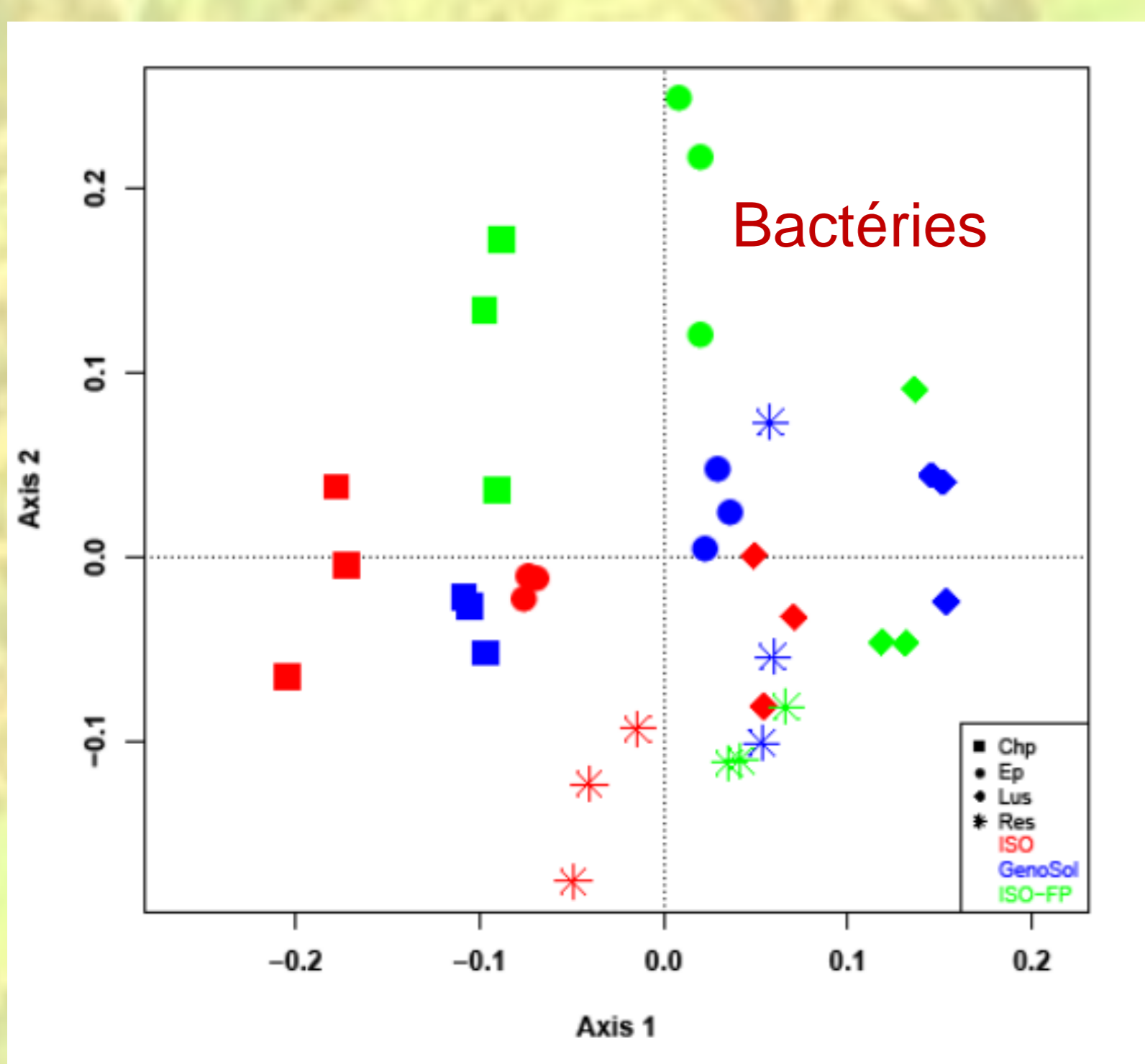
Evaluation de la qualité des ADN extraits:

- Quantification de l'ADN total extrait
- Quantification (qPCR) des gènes des ARNr 16S et 18S
- Profils de diversité (tRFLP) des Bactéries, Archaea, Fungi

Comparaison de trois méthodes d'extraction



- ➔ Procédures GenoSol-II et ISO-FastPrep: extraction d'autant ou plus d'ADN que la procédure ISO
- ➔ ISO-FastPrep: en moyenne 1,9 fois plus d'ADN fongique extrait qu'avec la méthode standard



- ➔ La procédure de broyage du sol (Bead Beating / FastPrep) influence fortement les profils de diversité
- ➔ Plus grande reproductibilité des résultats obtenus après broyage FastPrep

Conclusions - Perspectives

- ➔ Une modification simple de la procédure ISO (passage à un broyage FastPrep) permet d'extraire plus d'ADN, de détecter plus d'ADN d'Archaea et Fungi, et d'obtenir des profils de diversité plus reproductibles.
- ➔ Le pyroséquençage 454 va confirmer laquelle de ces procédures est la mieux appropriée pour détecter un maximum de diversité microbienne.

