



**HAL**  
open science

## Optimisation du pyroséquençage haut-débit pour caractériser la diversité taxonomique des communautés bactériennes des sols

Sébastien Terrat, Pierre Plassart, Richard Christen, Samuel S. Dequiedt, Tiffanie Regnier, Mélanie M. Lelievre, Virginie Nowak, Philippe P. Lemanceau, Pierre-Alain Maron, Christophe Mougel, et al.

### ► To cite this version:

Sébastien Terrat, Pierre Plassart, Richard Christen, Samuel S. Dequiedt, Tiffanie Regnier, et al.. Optimisation du pyroséquençage haut-débit pour caractériser la diversité taxonomique des communautés bactériennes des sols. Workshop "Interactions des Microorganismes avec leurs Environnements : Circulation, Adaptation", Jun 2012, Dijon, France. hal-01208716

**HAL Id: hal-01208716**

**<https://hal.science/hal-01208716v1>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

S. TERRAT<sup>1</sup>, P. PLASSART<sup>1</sup>, R. CHRISTEN<sup>2</sup>, S. DEQUIEDT<sup>1</sup>, T. REGNIER<sup>1</sup>, M. LELIEVRE<sup>1</sup>, V. NOWAK<sup>1</sup>, P. LEMANCEAU<sup>1</sup>, PA. MARON<sup>1</sup>, C. MOUGEL<sup>1</sup> et L. RANJARD<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Microbiologie du Sol et de l'Environnement et Plateforme GenoSol (UMR 1229), INRA/Université de Bourgogne, DIJON  
<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie virtuelle (UMR CNRS 6543), Université de Nice, NICE

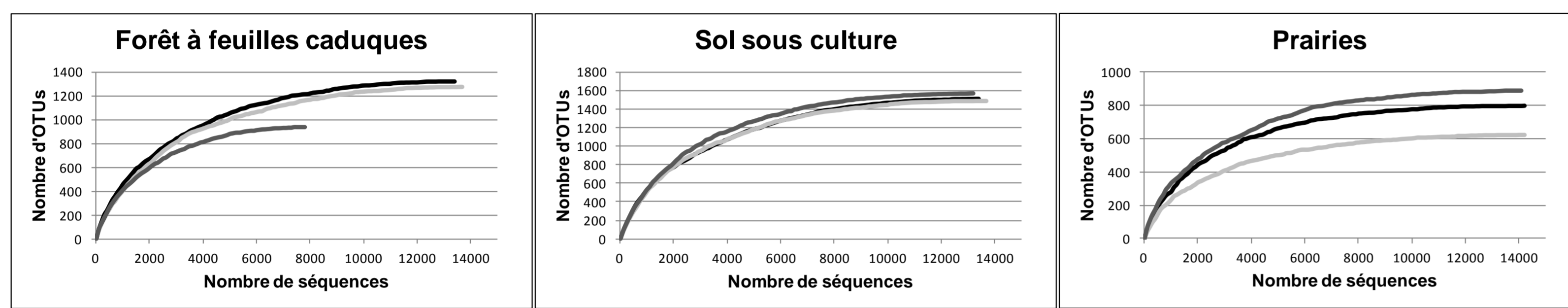
Contacts : [sebastien.terrat@dijon.inra.fr](mailto:sebastien.terrat@dijon.inra.fr) - [lionel.ranjard@dijon.inra.fr](mailto:lionel.ranjard@dijon.inra.fr)

## Problématique

La **diversité bactérienne** d'un sol est difficile à caractériser. Toutefois, d'importantes avancées en biologie moléculaire, comme le développement du **pyroséquençage**, ont permis d'obtenir plusieurs centaines de milliers de séquences à partir d'un ADN métagénomique, permettant une **meilleure caractérisation** de la diversité des communautés microbiennes du sol. Toutefois, dans un contexte où **l'écologie microbienne du sol** commence à s'accaparer les **échantillonnages de grande envergure** afin de mieux hiérarchiser les filtres environnementaux et les processus impliqués dans l'assemblage de ces communautés, il est nécessaire **d'identifier tous les biais méthodologiques** liés à ces nouvelles techniques (procédure d'extraction, profondeur de séquençage nécessaire, influence des tags ajoutés pour le multiplexage) qui peuvent entraîner une **faible généralité** des résultats obtenus.

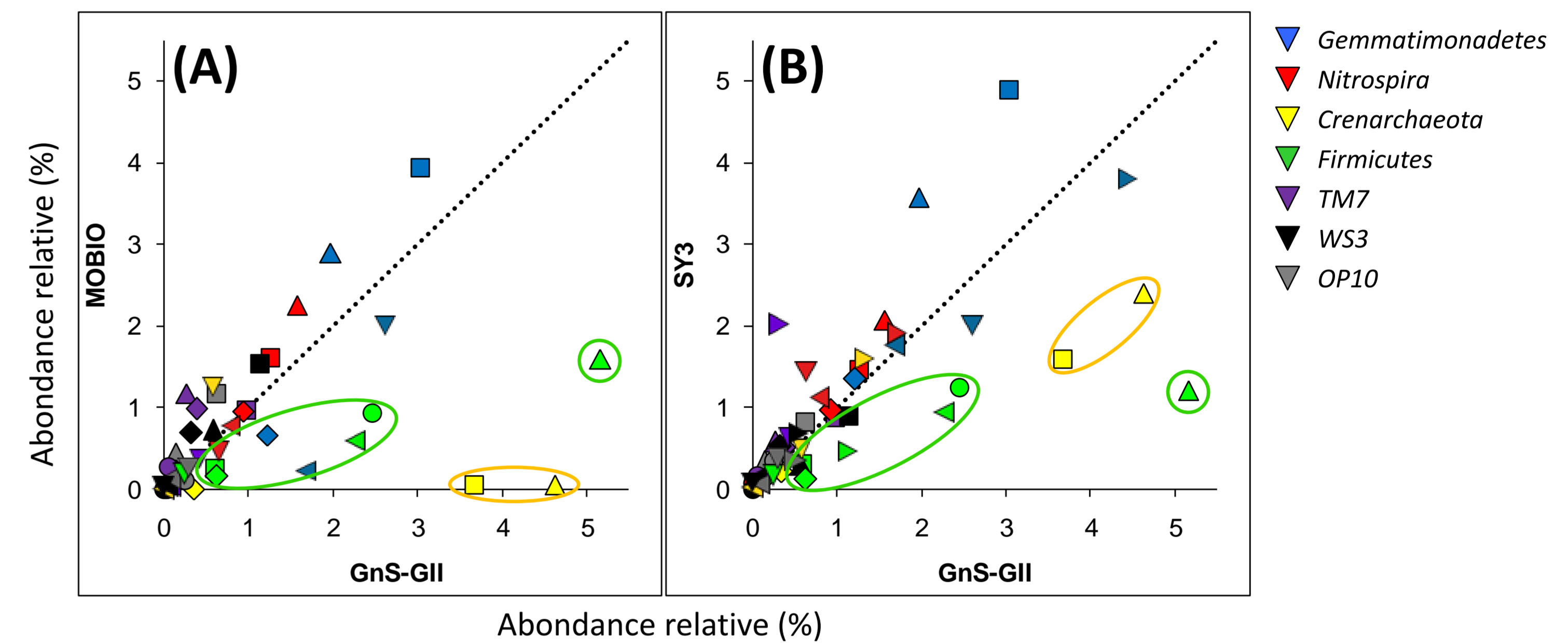
## Procédure d'extraction d'ADN de sol

- Evaluation de **3 procédures d'extraction d'ADN** (SY3, GnS-GII, un kit: Ultraclean Soil DNA Kit, MOBIO) pour déterminer la méthode la plus **représentative de la diversité indigène** des sols.
- Les sols étudiés ont été choisis pour leurs caractéristiques physico-chimiques variables et leurs différents modes d'usage.
- La **diversité bactérienne de chaque sol extrait** a été déterminée par **pyroséquençage de l'ADNr 16S** (Figs 1&2).



**Fig1.** Courbes de saturation déterminées pour chaque protocole et chaque sol au niveau du genre. Noir: GnS-GII, Gris foncé: SY3, Gris clair: MOBIO. Le protocole GnS-GII semble le protocole le plus adapté pour obtenir une bonne couverture des sols étudiés.

- Pour un même sol, le nombre de genres détectés varie de 1 à 26 % entre deux procédures, le protocole GnS-GII donnant la meilleure couverture (Fig1).
- Les *Firmicutes* et Les *Crenarchaeota* sont fortement sous-estimés avec SY3 et MOBIO, en comparaison avec GnS-GII (Fig2).



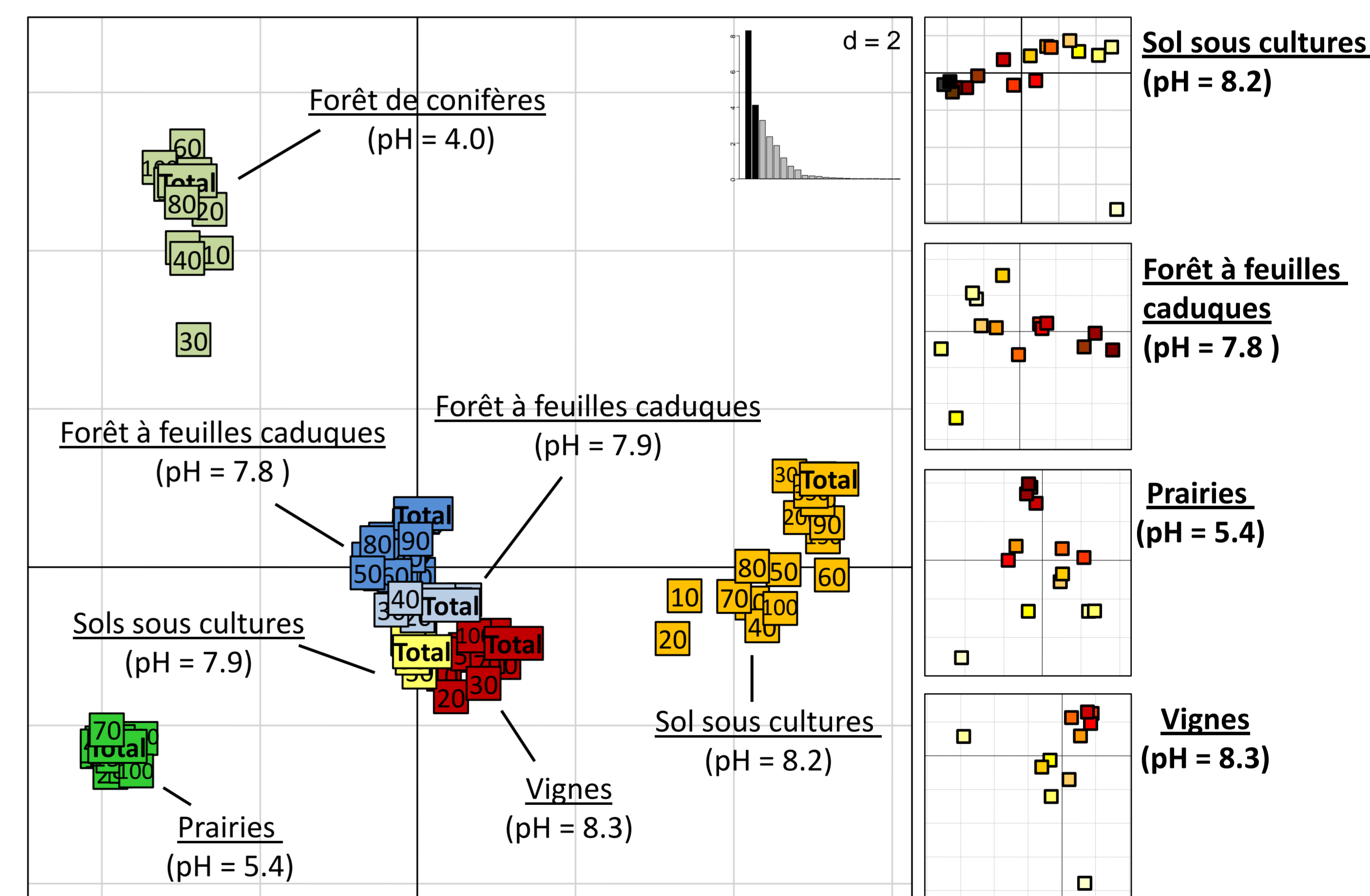
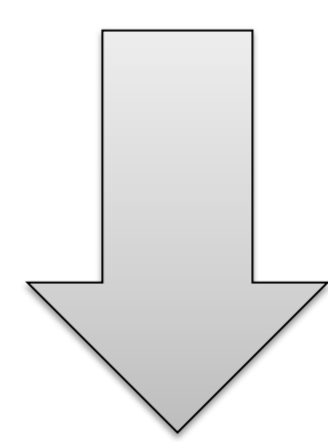
**Fig2.** Comparaison d'abondances relatives obtenues pour chaque protocole et chaque sol. Sols sous culture : ● ◆; forêt à feuilles caduques : ▲ ▼; forêt de conifères : ■; prairies : ◀ et vignes : ▶. (A) Comparaison de GnS-GII avec MOBIO, et (B) de GnS-GII avec SY3. Les *Firmicutes* et les *Crenarchaeota* sont largement sous-estimés par SY3 et MOBIO.

- ➔ La procédure d'extraction **GnS-GII est la plus efficace** pour détecter un maximum de groupes bactériens au sein des sols étudiés.

## Profondeur de séquençage

- La **diversité bactérienne de chaque sol** (choisis pour leurs caractéristiques physico-chimiques variables et leurs différents modes d'usage) a été déterminée par **pyroséquençage de l'ADNr 16S**.
- Afin de déterminer le **nombre de séquences** permettant une **bonne estimation de la diversité des communautés bactériennes** des sols étudiés, des **sous-jeux** de séquences ont été tirés aléatoirement sur les jeux complets obtenus (allant à plus de 400 000 séquences brutes pour certains sols).
- La structure des **communautés bactériennes détectées** a été comparée par ACP avec les abondances relatives au niveau du phylum (Fig3).

- Quelque soit le nombre de séquences utilisées, la **discrimination des différents sols étudiés est similaire** (ACP globale, Fig3).
- De 10 000 à 50 000 séquences, l'**abondance relative des groupes minoritaires (moins de 1% de la communauté totale)** varie fortement, ce qui entraîne une **variabilité des inventaires** (sous-ACP, Fig3).



**Fig3.** ACP générées avec les abondances relatives au niveau du phylum des sols étudiés. Les chiffres sont indiqués en milliers de séquences, Total: nombre de séquences maximal pour le sol donné. Les sous-ACP sont réalisées avec les sous-jeux de chaque sol de manière indépendante.

- ➔ 10 000 séquences est un minimum pour obtenir un **bon génotypage** et comparer efficacement différents sols.
- ➔ Cependant, pour avoir un **bon inventaire** de la diversité bactérienne des sols étudiés, il faut au moins **50 000 séquences**.

## Conclusion & Perspectives

Ces premières études nous ont permis **d'évaluer certains biais pour optimiser l'usage du pyroséquençage**, ceci afin d'étudier la **diversité taxonomique microbienne des sols**. D'autres études sont actuellement en cours, comme l'évaluation de l'influence du multiplexage des échantillons, nécessitant l'ajout de tags et/ou d'adaptateurs.

**Au final, toutes ces informations nous permettront de caractériser au mieux la diversité taxonomique des microorganismes du sol, et de l'appliquer en moyen débit sur les réseaux de surveillance des sols ou sur des chrono séquences à long terme.**