



HAL
open science

Test de comparaison entre le kit habituel NucleoSpin soil mono-colonne et le kit NucleoSpin soil 96 en plaque pour la purification d'ADN extrait de sols

Fanny Collin, Mélanie Lelievre

► To cite this version:

Fanny Collin, Mélanie Lelievre. Test de comparaison entre le kit habituel NucleoSpin soil mono-colonne et le kit NucleoSpin soil 96 en plaque pour la purification d'ADN extrait de sols. [Stage] INRAE. 2021. hal-03808311

HAL Id: hal-03808311

<https://hal.inrae.fr/hal-03808311v1>

Submitted on 10 Oct 2022

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.

COLLIN Fanny

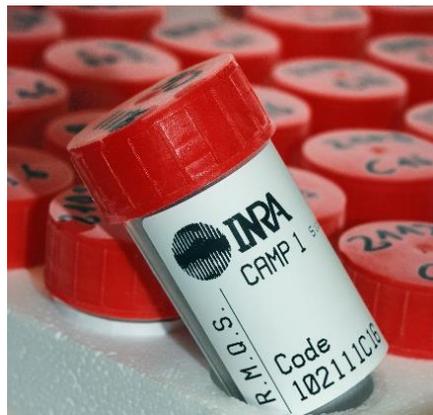
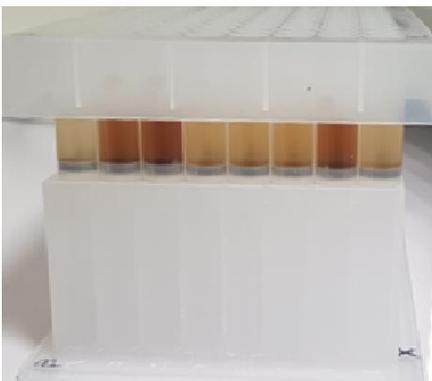
2^{ème} année de BTS Bio-Analyses et Contrôles
Promotion 2020-2021



Lycée le Castel
22, rue Daubenton
21000 Dijon



Test de comparaison entre le kit habituel NucleoSpin soil mono-colonne et le kit NucleoSpin soil 96 en plaque pour la purification d'ADN extrait de sols.



Maître de stage : LELIEVRE Mélanie
Stage effectué du 23/11/2020 au 22/01/2021



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche

Plateforme GenoSol
UMR 1347 Agroécologie
INRAE de Dijon
17 rue du Sully, 20065 Dijon Cedex

Sommaire

Remerciements

Lexique/Glossaire

Présentation de la structure d'accueil	1
I/ Présentation de l'INRAE	1
II/ Présentation du centre INRAE Bourgogne-Franche-Comté et du site de Dijon	1
III/ Présentation de l'UMR Agroécologie.....	2
IV/ Présentation de la plateforme GenoSol	3
Partie scientifique	5
I/ Contexte.....	5
II/ Extraction et purification de l'ADN à partir d'échantillons de sols	7
1) Extraction de l'ADN des sols	7
2) Purification de l'ADN.....	8
III/ Electrophorèse sur gel d'agarose avec coloration au BET	10
1) Principe et méthode	10
2) Analyse des résultats	11
IV/ Dosages et analyses pour une quantification spécifique des ADN propres	13
1) Dosage fluorométrique pour une quantification spécifique des ADN propres	13
2) Vérification de la qualité des ADN propres au Nanodrop	16
V/ Analyse de la qualité, de la fonctionnalité et de la composition des ADN propres par qPCR...19	
1) Principe et méthode	19
2) Résultats obtenus pour nos échantillons d'ADN propres des deux kits	23
Conclusions	26
I/ Conclusion scientifique.....	26
II/ Conclusion personnelle.....	26

Annexes

Remerciements

A l'issue de ce travail, j'aimerais exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à Madame Nathalie Munier-Jolain, présidente du centre INRAE de Dijon et Monsieur Philippe Lemanceau, directeur de l'Unité Mixte de Recherche AgroEcologie, pour m'avoir permis d'effectuer ce stage au sein de leurs locaux malgré la crise sanitaire.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur Samuel Mondy, responsable de la plateforme Genosol, qui m'a accueillie au sein de son équipe malgré le contexte sanitaire.

Je tenais tout particulièrement adresser mes sincères remerciements à Madame Mélanie Lelievre, responsable du Laboratoire d'Analyses et de Développements Moléculaires, qui a également été ma tutrice de stage, pour m'avoir accordé de son temps et de sa patience pour me former et m'apporter de nouvelles connaissances, me partager son savoir, ses techniques et astuces. Je la remercie de la confiance qu'elle m'a accordée durant ce stage ainsi que l'autonomie qu'elle a pu me donner lorsqu'elle a jugé bon de le faire. Je suis extrêmement reconnaissante pour tout ce qu'elle a fait pour moi, le soutien qu'elle m'a apporté, ses conseils, son aide, son suivi durant le stage puis post-stage.

Je souhaite remercier par la même occasion Madame Gwendoline Comment et Madame Solène Perrin, techniciennes employées au sein de la plateforme et qui ont pu m'aider, répondre à mes interrogations et m'apporter une aide technique. Je les remercie pour leur bonne humeur, leur joie de travailler ensemble et pour m'avoir permis de m'intégrer au sein de l'équipe ce qui a rendu le stage d'autant plus plaisant.

Je remercie aussi le reste du personnel et les autres stagiaires avec qui j'ai pu collaborer quelques fois : Céline Faivre-Primot, Julie Tripied, Joanne Petazzi, Virginie Nowak, Agathe Prin, Evert van Schaik, Thomas Defrance qui ont pu m'aider ou avec qui nous avons passé d'agréables moments.

Je tiens à remercier mon professeur encadrant ainsi que tous les autres professeurs pour leur suivi, leur soutien et leurs conseils.

Pour finir, j'adresse aussi mes remerciements aux membres du jury pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail.

Lexique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

BET : Bromure d'éthidium

CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique

CRG : Conservatoire des Ressources Génétiques microbiennes

Ct : Cycle threshold

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EUP : Eau Ultra Pure

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

LADM : Laboratoire d'Analyses et de Développements Moléculaires

LIMS : Laboratory Information Management System

NaCl : Chlorure de sodium

PCR : Polymerase Chain Reaction

qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SIE : Système d'Information Environnemental

TBE : Tris Borate EDTA

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : Ultra-Violet

Présentation de la structure d'accueil

I/ Présentation de l'INRAE

L'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement, INRAE, résulte de la fusion, en janvier 2020, de l'Institut National de Recherche en Agronomie, qui a été fondé en 1946, et de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture. Au départ, l'INRA avait été créé dans le but d'améliorer l'agriculture pour aider la France à répondre aux besoins alimentaires de sa population en pleine pénurie alimentaire. Ensuite, l'INRA s'est développé en différents pôles territoriaux notamment par région pour accroître son rendement et diminuer les famines toujours présentes. Après 1970, la production alimentaire de la France est relancée si fortement que les excédents de production sont exportés, l'INRA a donc décidé de changer son objectif et de viser maintenant une qualité alimentaire. Ainsi, l'INRA est devenu le premier institut de recherche agronomique dans le monde et le deuxième en sciences agricoles dans le monde. Aujourd'hui, l'INRAE est la première institution de recherche au monde dans le domaine de l'agriculture, l'alimentation et l'environnement.

A l'heure actuelle, l'INRAE œuvre pour mener des recherches et innover dans le but d'offrir une agriculture plus durable, meilleure pour l'environnement tout en satisfaisant les besoins français et en préservant une alimentation saine et de qualité sans nuire à l'environnement. L'INRAE est considéré comme un acteur de la bioéconomie en contribuant à une production et une utilisation durable et circulaire des ressources biologiques en réduisant l'usage du carbone fossile, diminuer les pertes et gaspillages et développer les territoires en préservant les ressources naturelles.

Comme le montre la [figure 1](#), depuis la fusion entre l'INRA et l'IRSTEA, l'INRAE est composé d'une communauté de 11 500 personnes divisée en 260 unités de recherches, 40 unités expérimentales, le tout regroupé au sein de 18 centres français.



Figure 1 : Organisation de l'INRAE sur le territoire français.

II/ Présentation du centre INRAE Bourgogne-Franche-Comté et du site de Dijon

L'INRAE situé à Dijon fait partie de l'un des 18 centres français, il s'agit ici du centre INRAE Bourgogne-Franche-Comté. Ce centre est réparti sur plusieurs sites dont le site de Dijon qui est implanté principalement sur le campus universitaire de Dijon, mais qui possède aussi une unité expérimentale sur le domaine d'Épouisse à Bretenière comprenant un site délocalisé à Chaux-des-Prés et une unité de recherche spécialisée sur la l'industrie de transformation laitière à Poligny. Ce centre pluridisciplinaire comprend un ensemble de recherches basées sur l'agroécologie comprenant :

- la biodiversité les interactions biotiques et les systèmes de culture
- le goût et l'alimentation
- les territoires ruraux et périurbains qui préoccupent grandement la société d'aujourd'hui et les enjeux pour le futur

Le centre, présenté en [figure 2](#), compte plus de 900 employés dont 40% issus de partenaires de sites tels que AgroSup Dijon, CNRS, CHU Dijon et des universités de Bourgogne et de Franche-Comté qui sont répartis en 7 unités :

- trois unités mixtes de recherche dont l'UMR agroécologie
- une unité propre de recherche,
- une unité sous contrat
- une unité expérimentale
- une unité d'appui



Figure 2 : Entrée et devantures des bâtiments de l'INRAE de Dijon.

Le centre INRAE Bourgogne-Franche-Comté est dirigé par Nathalie Munier-Jolain. En 2019, le budget global pour le centre est de 34,1 millions d'euros qui ont permis une activité scientifique de 632 publications scientifiques.

III/ Présentation de l'UMR Agroécologie

L'unité mixte de recherche (UMR) agroécologie a été créée en 2012, elle regroupe l'INRAE, AgroSup Dijon, l'Université de Bourgogne-Franche-Comté et le Centre National de la Recherche Scientifique. L'UMR Agroécologie met en avant son objectif principal qui est le développement de l'agriculture durable permettant une production qualitativement et quantitativement en phase avec les besoins alimentaires tout en respectant l'environnement ([figure 3](#)). De plus, l'accroissement de la population mondiale oblige la rencontre d'objectifs agronomiques et environnementaux. L'unité a donc plusieurs enjeux : assurer une production agricole de qualité et en quantité suffisante pour nourrir toute la population, proposer des systèmes de culture innovants en respectant et valorisant la biodiversité et l'environnement, analyser comprendre et agir sur les interactions et régulations au sein des communautés à différentes échelles spatiaux-temporelles, mais aussi réduire l'utilisation d'intrants agricoles. Elle doit donc faire face aux défis de la sécurité alimentaire dans le monde, du changement climatique, de la restauration de la biodiversité ainsi que l'épuisement de ressources pour obtenir une production agricole suffisante et préservant l'environnement, notamment l'eau et les sols.



Figure 3 : Banderole et logo de l'UMR Agroécologie.

Cette UMR est constituée de différents pôles :

- BIOmE : BIOlogie et fonctions Ecosystématiques des sols
- GEAPSI : déterminismes Génétiques et Environnementaux de l'Adaptation des Plantes à des Systèmes de cultures Innovants
- GESTAD : Gestion Durable des Adventices
- IPM : Interactions Plantes Microorganismes

En plus de ces différents pôles, l'UMR Agroécologie comprend aussi plusieurs plateformes telles que la plateforme GenoSol, un centre de microscopie intégré à la plateforme fédérative DImaCell, la Plateforme de Phenotypage Haut Débit (PPHD) et un ensemble de ressources biologiques (sols, graines, microorganismes).

Enfin, l'UMR Agroécologie emploie à elle seule 350 personnes de différents parcours professionnels et qui ont donc différentes fonctions. En effet, comme le montre l'organigramme (figure 4), les personnes titulaires sont principalement des chercheurs ainsi que les techniciens et les assistants ingénieur. Mais tous ceux-ci sont devancés par des postes non-titulaires tels que des étudiants stagiaires ou des emplois de post-doctorants.

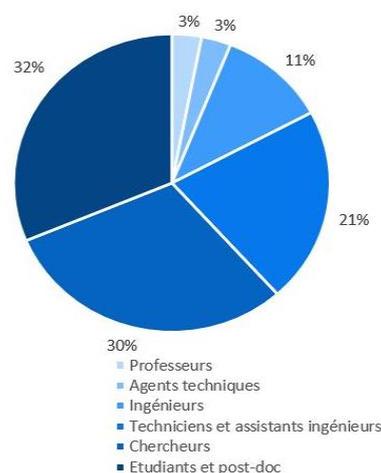


Figure 4 : Organigramme de l'organisation du personnel au sein de l'UMR en 2020 (%).

IV/ Présentation de la plateforme GenoSol

La plateforme GenoSol, adossée à l'UMR Agroécologie est une structure unique en Europe. Il s'agit d'une plateforme analytique qui est spécialisée dans la conservation et l'analyse microbienne de sols provenant d'échantillonnage de grande envergure. Cette plateforme, créée en 2008, s'articule autour de trois domaines :

Le Conservatoire de Ressources Génétiques :

Le CRG intervient au niveau européen en conservant des sols naturels et agricoles venus principalement de France mais aussi d'Europe, afin de préserver les ressources génétiques comme l'ADN et de pouvoir les mettre à disposition de la communauté scientifique.

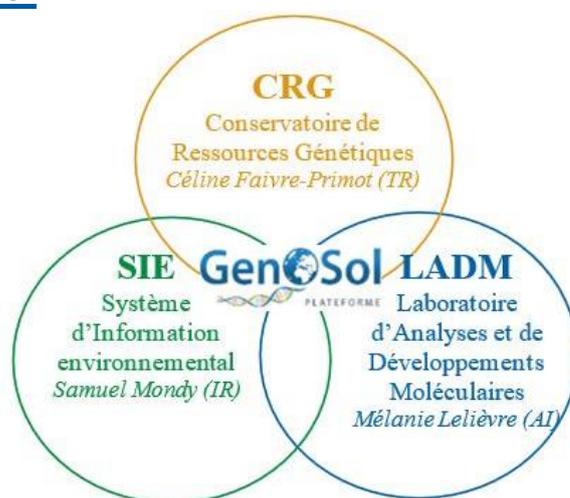


Figure 5 : Triptyque de l'organisation de la plateforme GenoSol.

Les échantillons de sols proviennent de réseaux de surveillance de sols, d'observatoire de recherche en environnement et de sites expérimentaux, ainsi que de réseaux d'exploitations agricoles. Ceux-ci sont impliqués dans une réflexion sur l'évaluation des impacts environnementaux, des traitements apportés au sols et de leurs modes d'usage. Le conservatoire de la plateforme est donc un outil permettant de renforcer les systèmes d'observations et d'analyses de la biodiversité des sols.

Les rôles du CRG s'articulent autour du prélèvement et de la préparation des échantillons de sols à conserver (figure 5). Ils sont préparés dans un espace dédié de plus de 300m² où ils sont tamisés, puis lyophilisés et enfin stockés dans les congélateurs à -40°C. A ce jour plus de 22000 sols y sont stockés et 1000 à 1500 nouveaux sols sont archivés en moyenne par année.

Le Laboratoire d'Analyses et de Développements moléculaires : Le LADM a deux objectifs :

- Extraire et caractériser la diversité microbienne dans les sols à l'aide d'outils moléculaires tels que la PCR quantitative (qPCR) ou encore le séquençage d'ADN. Les méthodes ont été standardisées afin d'établir un référentiel de données.
- Réaliser la veille technologique et le développement de nouvelles méthodes pour améliorer l'accès à cette diversité microbienne

Situé au rez-de-chaussée du bâtiment Dommergues, le LADM possède 600 m² de laboratoires destinés aux différentes analyses toujours en suivant une marche en avant. L'an dernier, plus de 3000 sols ont servis à réaliser les 6987 analyses au sein du LADM.

Mon stage se situe dans le contexte d'une veille technologique du LADM pour tester un kit de purification d'ADN de sols en plaque de 96 échantillons afin d'augmenter grandement le débit de purification sans changer le résultat.

Le Système d'Information Environnemental : Le SIE est centré sur une base de données « MicroSol » retraçant la vie des échantillons, les analyses effectuées et les données de caractérisation génétique des sols. Ainsi est établi un référentiel permettant le diagnostic de la qualité microbienne des sols.

La plateforme travaille avec des applications managées par le SIE pour une meilleure organisation journalière :

- GIMACO (Gestion Intégrée du MATériel et du CONSommable) permet la gestion des stocks, commandes, fournisseurs
- La gestion documentaire regroupant tous les protocoles, trames, instructions de la plateforme ainsi qu'un pipeline bio-informatique.
- Un calendrier de réservation des équipements en ligne
- Le site internet de la plateforme

La plateforme GenoSol peut aussi accueillir en accès dit « plateau » des personnes qui utilisent les équipements et les infrastructures qu'ils n'ont pas dans leurs laboratoires. Cet accès leur permet de réaliser leurs analyses en autonomie permise grâce à une charte d'utilisation et le suivi/formation par le personnel de la plateforme.

Depuis septembre 2018, la plateforme GenoSol est certifiée ISO 9001 version 2015 par LRQA pour la conservation et l'analyse de la diversité microbienne des ressources génétiques (figure 6). Ce certificat est délivré pour 3 ans. La plateforme suit donc une politique qualité révisée annuellement par deux audits en intégrant toujours les évolutions et enjeux nouveaux par un processus d'amélioration continue et de management de la qualité. Chaque processus doit être entièrement maîtrisé et référencé dans un cahier de laboratoire pour la traçabilité. Chaque donnée est enregistrée dans la base de données pour le suivi des analyses et assurer aux clients une démarche qualité fonctionnelle et contrôlée. A l'heure actuelle, la plateforme développe un LIMS (Laboratory Information Management System) afin de gérer les données des différents projets de l'édition de la demande jusqu'au rendu des résultats.



Figure 6 : Logo de certification ISO 9001:2015 délivré par le LRQA.

Partie scientifique

I/ Contexte

Le sol est une matrice essentielle à la vie sur Terre puisqu'il s'agit du point de départ des cultures humaines, le support de l'agriculture. Le sol est un ensemble complexe qui a plusieurs rôles vitaux :

- apporter des éléments nutritifs pour la production agricole des végétaux
- réguler les flux de matière et les échanges
- servir de réservoir tampon en luttant contre les inondations ainsi que de filtre pour l'eau de pluie
- assurer la production de biomasse
- permettre aussi le développement de la biodiversité
- source principale de matières premières pour les industries.

Comme le montre la figure 7, le sol est aussi une zone de stockage du carbone ainsi que de l'eau de pluie, qui est toujours en interaction avec les éléments qui l'entoure tels que l'air, l'eau, les roches ainsi que les êtres vivants. Il constitue une importante réserve de la diversité microbienne puisque l'on retrouve, dans 1g de sol, des milliards de microorganismes tels que des bactéries, des protozoaires, des champignons, la microfaune, la mésofaune, des particules virales et bien d'autres. Cette diversité microbienne a un rôle très important puisque les microorganismes ont un rôle fondamental dans le fonctionnement du sol. En effet, ils permettent au sol de stocker et réguler le cycle du carbone et de l'azote mais aussi de dégrader des polluants organiques comme les dérivés de pétrole ou les pesticides en petite quantité. La diversité biologique d'un sol agit comme un activateur naturel, un catalyseur augmentant le rendement du sol notamment en agriculture où l'on a pour but de développer une agriculture qui ne détériore pas la vie biologique et physique du sol. Le sol est donc un pilier essentiel à la vie sur Terre grâce à ses nombreuses fonctions, mais il s'agit d'une ressource limitée. Par ailleurs, la mondialisation par le développement de l'industrie, la pollution par l'Homme ainsi que l'usage intensif de pesticides créés beaucoup de perturbation au niveau du sol notamment en détériorant la diversité microbienne de celui-ci donnant ainsi un sol moins fertile et donc une perte de ses intérêts. Enfin, les communautés microbiennes sont directement impactées par l'évolution du sol puisqu'elles subissent rapidement les stress environnementaux comme l'érosion, l'acidification, le tassement du sol, le manque d'eau...



Figure 7 : Les grandes fonctions d'un sol.

On peut donc retenir que les microorganismes sont très utiles pour le bon fonctionnement d'un sol et peuvent devenir ainsi un bio-indicateur de la qualité d'un sol. Il est donc d'un grand intérêt d'étudier et de comprendre son fonctionnement. Cela se fait notamment par l'analyse de la diversité microbienne permettant d'acquérir de plus amples connaissances de la microbiologie des sols pour mettre en place des systèmes de cultures avec un meilleur rendement sans nuire à l'environnement. Plusieurs instituts et laboratoires se penchent donc sur l'étude de la diversité microbienne des sols dont la plateforme GenoSol. En effet, GenoSol s'intéresse principalement à deux communautés microbiennes très présentes dans les sols, qui sont les bactéries et les champignons.

La plateforme réalise de nombreuses analyses en partant de l'extraction d'ADN de sol en allant jusqu'à des analyses moléculaires poussées tels que la PCR et le séquençage. Ces analyses se concentrent notamment sur deux gènes polymorphes et multicopies qui codent pour les sous-unités ARNr 16s pour l'étude des communautés bactériennes et ARNr 18s pour l'étude des communautés fongiques.

Cependant, le débit est très intense et certaines analyses prennent beaucoup de temps, la plateforme est donc à la recherche de nouvelles méthodes permettant d'améliorer ce débit afin de traiter le plus d'échantillons possibles en un temps limité. C'est notamment le cas pour l'étape de purification des ADN puisque celle-ci est effectuée en mono-colonne, les échantillons sont donc traités un par un rendant cette étape chronophage. La plateforme souhaite donc trouver une nouvelle méthode de purification permettant d'améliorer le débit d'échantillons traités sans modifier les résultats afin de garder une homogénéité avec la base de données.

Le but de mon stage au sein de la plateforme est donc de comparer deux kits de purification d'ADN extrait de sol : le kit habituel *NucleoSpin® Soil* - Macherey-Nagel mono-colonne (NS1) utilisé pour toutes les analyses d'ADN de la plateforme et le kit *NucleoSpin® Soil 96* - Macherey-Nagel en plaque (NS96), qui permettrait d'augmenter grandement le débit de purification.

La plateforme travaille sur une vaste gamme d'échantillons de sols ayant des propriétés physico-chimiques très différentes qui ont un impact sur la purification d'ADN. C'est pourquoi, pour mener à bien mon projet, j'ai travaillé sur 10 sols très différents avec des caractéristiques opposées pour comparer les différents facteurs et évaluer au mieux l'efficacité du protocole peu importe le type de sol. Le tableau 1 montre les différents types de sols composant notre échantillonnage ainsi que leurs spécificités :

Nom de l'échantillon de sols dans la base de données MicroSol	Type de sol et caractéristiques (profondeur de prélèvement)	Code simplifié attribué pour l'analyse
100679C16	Tourbe très riche en matière organique (0 à 30cm)	679C16
B10F76-3	Forêt (1,5 à 16,5cm)	F76
Lus_2015_P2.7_H1	Culture prairie (0 à 30cm)	Lus_2015
Reference LADM_Bretonnière.1	Culture argileuse (0 à 20cm)	Bret
Reference LADM_Colmar.1	Culture limono-argileux (0 à 20cm)	Colm
Reference LADM_Jura.1	Forêt, argilo-calcaire (0 à 20cm)	Jura
Reference LADM_La Grande Motte.1	Sable, vieille pinède = plantation de pins, plus de 20 ans (inconnue)	G Motte
Res0_Lus2013_G9A_c	Culture prairie (0 à 20cm)	Lus_2013
Res2010_P6_5_15	Sol pollué aux métaux, limono-argileux, ancienne plaine maraîchère (0 à 20cm)	RES_2010
SIC2010_B1p44	Sol agricole riche en matière organique (0 à 25cm), limon profond	SIC_2010

Tableau 1 : Types de sols utilisés ici et leurs caractéristiques.

Comme le montre la (figure 8), chaque sol est testé en 5 répétitions afin de vérifier la répétabilité et la reproductibilité du kit. Les échantillons sont traités similairement et simultanément sur chaque étape avec des conditions identiques (même nombre de congélation/décongélation, même mode de conservation entre chaque étape...) afin de limiter les biais de manipulation externes aux kits. Le processus se déroule en plusieurs étapes :

- l'extraction des ADN à partir du sol
- la purification des ADN bruts obtenus en testant séparément les deux kits NS1 et NS96
- l'évaluation de la qualité des ADN propres par méthode spectrophotométrique ainsi que par électrophorèse en gel d'agarose
- l'étude de la quantité en ADN obtenue pour les deux kits à l'aide d'un dosage fluorométrique
- la comparaison des résultats obtenus avec des analyses moléculaires habituelles, ici il s'agit d'une qPCR

Les ADN sont conservés dans le but d'effectuer, plus tard, s'il s'avère nécessaire, d'autres analyses moléculaires comme le séquençage.

Figure 8 : Schéma de contexte.



II/ Extraction et purification de l'ADN à partir d'échantillons de sols

1) Extraction de l'ADN des sols

L'extraction d'ADN microbien est réalisée directement à partir d'un échantillon de sol lyophilisé stocké au Conservatoire de Ressources Génétique et a pour but d'extraire les acides nucléiques des microorganismes présents dans les échantillons.

L'extraction de l'ADN de sols se réalise à partir de 1g de sol et se divise en trois étapes, le schéma présenté en [figure 9](#) présente son déroulement :

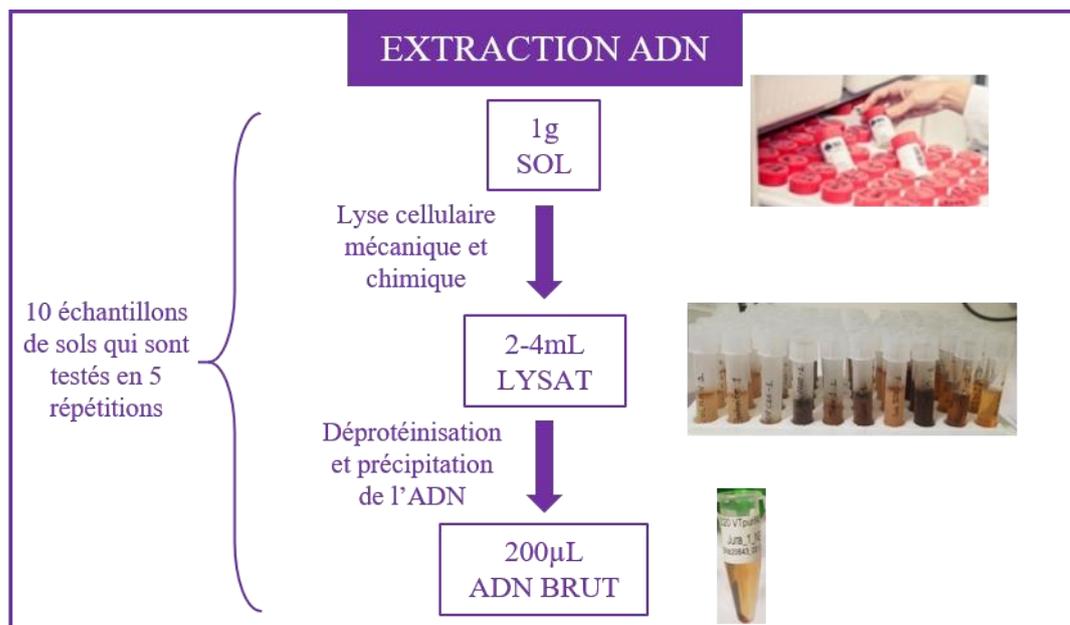


Figure 9 : Schéma de principe de l'extraction d'ADN de sol.

➤ **Étape 1 = Broyage mécanique et lyse chimique des membranes cellulaires** : Cette étape a pour but de casser les agrégats de sols, les cellules et percer les membranes. Elle est effectuée grâce à des billes de différentes tailles et matières auxquelles est ajouté un tampon qui va favoriser la lyse chimique à chaud après un passage dans un broyeur nommé FastPrep-5G à 4m/sec pendant 90 secondes ([figure 10](#)).

Composition du tampon de lyse d'extraction pour un échantillon (5 mL) :

Composants	Volume	Type, rôle
Tris HCl pH8	0,5 mL	Tampon qui permet de garder un pH constant
EDTA pH8	1 mL	Acide, chélateur de cations (Ca^{2+} et Mg^{2+})
NaCl	0,5 mL	Solution minérale, interactions ADN-protéines et éclatement des cellules par phénomène d'osmose
SDS 20%	0,5 mL	Détergent, lyse des membranes cellulaires
Eau Ultra Pure	2,5 mL	Diluant



Figure 10 : Broyage mécanique au FastPrep.

A l'issue de cette étape, une centrifugation est réalisée pour séparer d'une part le culot contenant les débris cellulaires, le reste du sol, les billes et d'autre part le surnageant qui contient l'ADN et les protéines en suspension dans le tampon d'extraction. Le surnageant récupéré est nommé « lysat ».

➤ Etape 2 = Déprotéinisation de l'ADN : Le but ici est d'enlever les protéines dénaturées ainsi que d'autres particules que l'on peut retrouver en suspension dans le lysat. Cette étape est effectuée sur seulement 1mL de lysat issu de l'étape 1. Cet échantillon de lysat est mis en présence d'acétate de potassium conservé à -20°C et stable afin de précipiter les protéines formant des cristaux. Une centrifugation permet de regrouper les protéines dans un culot, l'ADN en suspension dans le surnageant sera ainsi récupéré.

➤ Etape 3 = Précipitation de l'ADN : Cette étape a pour but de récupérer l'ADN dans de l'Eau Ultra Pure et de le concentrer en éliminant les sels des tampons utilisés précédemment. Pour cela, l'ADN est précipité en présence d'isopropanol pendant 1h à -20°C et se retrouve ainsi dans le culot après centrifugation. Le surnageant contenant les solvants et quelques polluants est éliminé. Le culot est ensuite séché à 60°C dans une étuve pour éliminer les restes de solutions néfastes à l'ADN et pour les analyses futures. Enfin, le culot d'ADN est repris en suspension dans 200µL d'EUP, on obtient ainsi un ADN brut.

Cet ADN est qualifié de brut car il contient encore des polluants indésirables tels que des macromolécules, des sucres accrochés à l'ADN et surtout des acides humiques, polymères avec un fort poids moléculaire donnant au sol sa couleur brune et qui sont aussi responsables de la coloration de l'ADN brut. Riche en carbone, ils proviennent d'une condensation oxydative de composés phénoliques liés à des acides aminés, peptides et polysaccharides et donnent au sol sa couleur brunes.

Ce protocole est appliqué sur chacun des 10 sols testés et ceux en 5 répétitions soit en tout 50 échantillons. Sont obtenus 200µL d'ADN brut pour chaque échantillon, or habituellement seuls 100µL sont purifiés pour réaliser ensuite les analyses moléculaires. Dans notre cas, ils sont aliquotés en 3 tubes afin qu'un même ADN brut soit purifié sur chacun des deux kits comme le montre la [figure 11](#) : 90µL pour la purification NS1, 90µL pour la purification NS96 et 20µL pour la vérification sur gels.

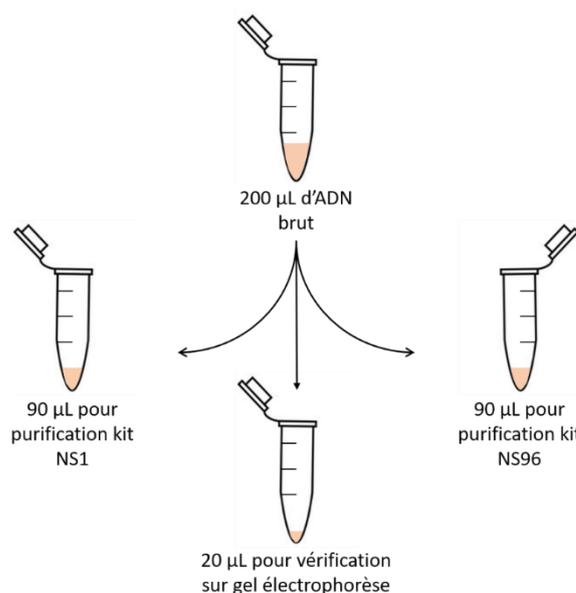


Figure 11 : Séparation des 200µL d'ADN brut en 3 aliquots.

2) Purification de l'ADN

L'objectif ici est de purifier les ADN bruts obtenus grâce à l'extraction d'ADN de sol. Ainsi, on obtient des ADN purifiés, limpides, sans polluants ni contaminants, de qualité et en quantité suffisante pour ensuite effectuer différentes analyses moléculaires.

a) *Principe et méthode de la purification d'ADN extrait de sol.*

La purification de l'ADN est réalisée à l'aide d'un kit *NucleoSpin Soil* (Machery-Nagel). Ce kit est basé sur deux colonnes ayant toutes deux des principes et rôles différents ([figure 12](#)) :

- La première colonne est basée sur le principe de tamis moléculaire puisqu'elle contient une membrane filtrante. Elle permet ainsi, en présence d'une solution de lyse de composition gardée secrète par le fabricant, de filtrer les échantillons en retenant les plus grosses impuretés tandis que l'ADN lui passe dans les pores du filtre et se retrouve ainsi dans le filtrat.
- La deuxième est une colonne d'affinité-exclusion contenant une membrane qui permettra de laver en partie l'ADN des petits contaminants dont les acides humiques pour avoir des ADN propres et ainsi réaliser les analyses moléculaires nécessaires. L'affinité-exclusion s'effectuée en trois temps :

- Dans un premier temps, l'ADN récupéré de la colonne précédente est passé dans cette colonne en présence de tampon *Buffer SB* et va se fixer sur la membrane, c'est l'étape d'affinité. La membrane de silice fixe sélectivement les ADN suite à l'abaissement du pH par le tampon. De plus, ce tampon contient du thiocyanate de guanidine, puissant agent chaotropique qui dénature les protéines et donc inactive des enzymes tels que la DNase et permet une meilleure adhésion de l'ADN à la membrane.
- Dans un second temps, deux tampons sont ajoutés dans la colonne afin d'effectuer les lavages de la membrane en gardant toujours notre ADN fixé par présence de Guanidine hydrochloride, d'isopropanol et d'éthanol. Ces trois molécules vont ainsi décrocher les polluants présents sur les parois ou sur la membrane pour purifier l'ADN.
- Enfin, une fois lavé, l'ADN est élué par ajout d'un tampon d'élué (de composition non donnée par le fabricant du kit). Ce tampon a pour but d'amener la membrane de silice dans des conditions physico-chimiques afin d'exclure l'ADN fixé sur celle-ci. En effet, ce tampon va apporter un pH plus élevé de manière à être en pH basique pour diminuer l'affinité entre l'ADN et la membrane, casser les liaisons d'affinités et ainsi éluer l'ADN par centrifugation.

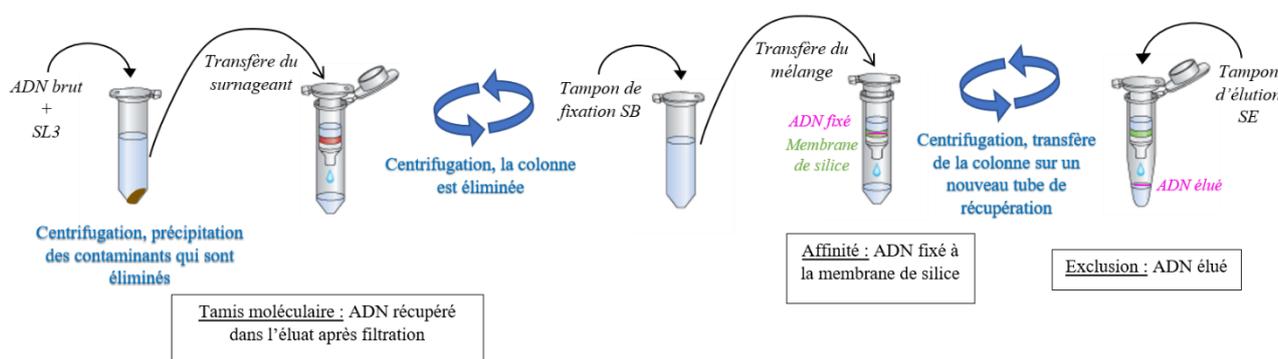


Figure 12 : Schéma de principe de la purification avec le kit mono-colonne NS1.

b) Comparaison des caractéristiques des deux kits NucleoSpin Soil

Le protocole de purification habituel utilise le kit NucleoSpin Soil en mono-colonne que l'on a surnommé ici NS1. Ce kit permet donc de traiter les échantillons un à un ce qui rend la manipulation assez longue, d'où la volonté d'augmenter le débit. Pour ce faire, une variante du kit habituel est disponible afin de traiter les échantillons par plaque de 96. Le principe de la purification est identique pour les deux kits puisque les réactifs sont les mêmes et les membranes utilisées sont identiques. Tout de même, ils possèdent certaines différences notamment au niveau de la prise en main. Le [tableau 2](#) met en évidence les caractéristiques communes aux deux kits (en noir) ainsi que les caractéristiques différentes (en bleu) :

Caractéristiques	Kit mono-colonne habituel <i>NucleoSpin® Soil</i> - Macherey-Nagel = NS1	Kit en plaque <i>NucleoSpin® Soil</i> 96 - Macherey-Nagel = NS96
Nombre d'échantillons traité	1 échantillon par colonne	96 échantillons par plaque
Capacité maximale de fixation de l'ADN	50 µg	50 µg
Nombre d'échantillons traités par séries entre 2 à 3h	30 échantillons	96 échantillons par plaque avec possibilité de faire 2 plaques en même temps
Volume d'élué	2 x 30µL	3 x 30µL
Vitesse de centrifugation	11000 g	5485 g

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques techniques des deux kits.

La principale différence est le fait de travailler en plaque pour le kit NS96, ce qui nécessite du matériel adapté notamment une centrifugeuse dite « Deepwell » ce qui possède une vitesse maximum de centrifugation plus faible qu'une centrifugeuse classique pouvant influencer la quantité et/ou la qualité de l'ADN récupéré. Ceci a notamment une répercussion sur le volume d'élution puisqu'avec 2 x 30 µL d'élution en plaque, on obtient un volume final élué inférieur à 50µL d'où le fait d'éluer en 3 x 30 µL pour le kit NS96.

Dans les deux cas, l'ADN obtenu se doit d'être limpide car il est censé être débarrassé des polluants néfastes aux futures analyses moléculaires, on l'appelle ainsi ADN propre. Il peut être conservé quelques jours à 4°C en vue de faire des analyses moléculaires, s'il n'est pas utilisé dans les jours à venir, il doit être conservé à -20°C jusqu'aux futures analyses.

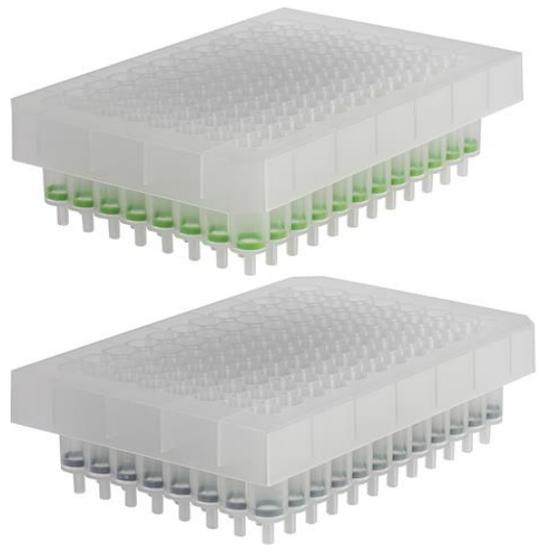


Figure 13 : Plaque colonne *NucleoSpin Soil Binding Plate* et *NucleoSpin Inhibitor Removal Plate*.

III/ Electrophorèse sur gel d'agarose avec coloration au BET

1) Principe et méthode

Les 5 répétitions d'ADN propres purifiés issus de 10 sols pour les deux protocoles de purifications ont été déposés sur gel d'agarose pour réaliser une électrophorèse afin de visualiser les fragments ADN.

Nous cherchons ici à visualiser la différence entre les ADN propres NS1 et les ADN propres NS96 lors d'une électrophorèse en comparant la présence ou l'absence de co-extraits. Cela permet aussi de vérifier la répétabilité entre les 5 répétitions d'ADN propres issues d'un même échantillon de sol.

L'électrophorèse a pour but d'imposer un courant électrique aux ADN qui vont ainsi migrer par attraction de la borne opposée. En effet, les ADN étant chargés négativement, seront attirés en direction de l'anode qui elle est la borne positive. C'est donc pour cela que les puits de dépôts sont du côté de la cathode, afin de permettre une bonne migration des ADN comme le montre la figure 14. Par ailleurs, plus les fragments d'ADN seront de petite taille, plus ils arriveront à passer dans les mailles du gel et migreront donc plus loin que les gros fragments. L'électrophorèse permet donc de séparer des molécules d'ADN grâce à un champ électrique imposant ainsi une migration des ADN vers l'anode.

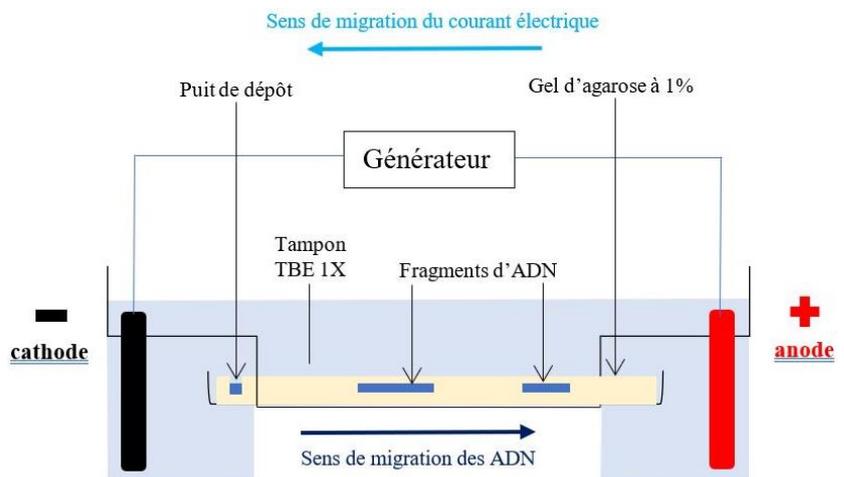


Figure 14 : Schéma du fonctionnement d'une électrophorèse.

Pour réaliser cette électrophorèse, il faut préalablement préparer :

- du tampon TBE 1X à partir d'une solution mère de TBE 10X en réalisant une dilution au 1/10
- un gel d'agarose à 1%, c'est-à-dire 1g d'agarose pour 100mL de TBE 1X à chauffer au micro-ondes
- le montage du support avec un ou plusieurs peignes pour réaliser les dépôts dans lequel sera coulé le gel jusqu'à polymérisation.

Une fois polymérisé, le gel est placé dans une cuve électrophorèse remplie de tampon TBE 1X. Les dépôts sont réalisés dans les puits formés par le peigne au montage. Les échantillons sont entourés par 5 μ L du marqueur de taille qui sert d'indicateur pour la taille des fragments. Les dépôts des échantillons sont constitués de 10 μ L d'ADN mélangé à 5 μ L de bleu de dépôt qui permet non seulement de suivre la migration durant l'électrophorèse en visualisant un front de migration, mais surtout permet d'alourdir les échantillons pour qu'ils tombent directement dans le fond du puit. La migration s'effectue pendant environ 2h00 à courant constant de 70mA.

Quand la migration est terminée, le gel est coloré 15 à 30 minutes dans un bain de Bromure d'Ethidium (BET) qui, en s'intercalant entre les bases de l'ADN, va émettre une fluorescence sous ultra-violets (UV). Le gel est désaturé en BET dans un bain d'eau pendant 5 à 10 minutes avant d'être révélé dans un imageur, ici un UVIDOC qui émet des UV dans une enceinte close reliée à une caméra permettant de prendre des photos des gels sous UV. L'image est récupérée directement sur l'appareil UVIDOC à travers une connexion réseau depuis n'importe quel poste informatique de la plateforme.

Le BET est un intercalant de l'ADN qui a la particularité de se fixer dans la double hélice de l'ADN bicaténaire par des liaisons faibles entre les paires de bases. Cette propriété rend le BET dangereux et le classe dans la catégorie des CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) comme le montre le pictogramme en [figure 15](#). Il faut donc le manipuler avec précautions. C'est pourquoi la plateforme possède un protocole et des consignes de sécurité strictes ([annexe 1 point sécurité](#)). En effet, le BET est manipulé dans une salle dédiée, sous sorbonne avec des Equipements de Protection Individuelle dédiés (gants, blouse, manchettes et sur-chausses). La plateforme a défini des niveaux d'habilitations pour l'accès à cette pièce. Pour ma part, j'ai été formée au niveau 1 c'est-à-dire un accès simple d'utilisation de la salle. Ce niveau ne permet pas de gérer l'entretien de la pièce ni la préparation des bains.



Figure 15 : Pictogramme CMR.

2) Analyse des résultats

L'expérience a été réalisée en deux fois, une migration avec les échantillons d'ADN propres NS1 et une autre migration avec les échantillons d'ADN propres NS96.

Pour chaque migration est réalisé un gel en grand format qui sera divisé en trois grâce à l'utilisation de 3 peignes de 20 puits. La [figure 16](#) présente le résultat du gel 1 obtenu pour les ADN propres NS1, tous les gels sont présentés en [annexe 2](#). Le plan de dépôt est similaire pour chaque migration, les échantillons sont déposés à la suite en quintuplas de sols avec aux extrémités des gels un marqueur de taille. Cette figure met en évidence plusieurs éléments tels que la ligne de dépôts, le front de migration, une piste d'ADN ou encore le marqueur de taille.

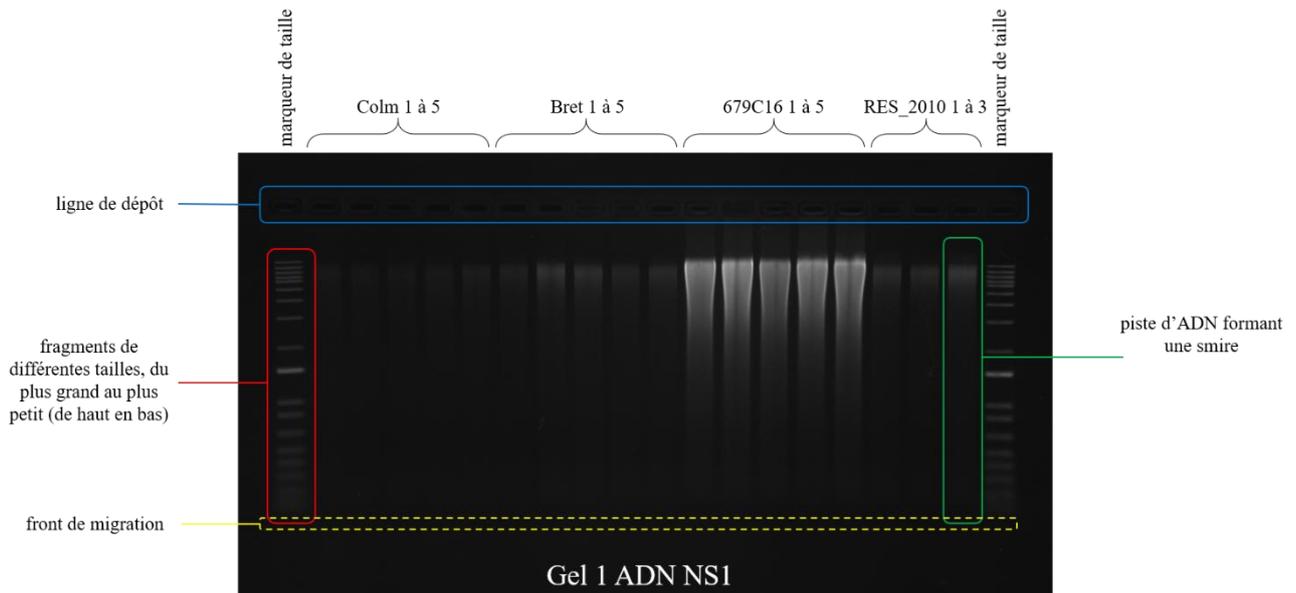


Figure 16 : Résultats du gel électrophorèse 1 des ADN propres NS1.

A présent, il s'agit de comparer les résultats obtenus entre les ADN propres NS1 et NS96 issus d'un même échantillon d'ADN brut. Pour chacune des expériences, les résultats obtenus pour les trois gels sont similaires, la comparaison entre NS1 et NS96 sera donc présentée uniquement sur le premier gel de chaque catégorie.

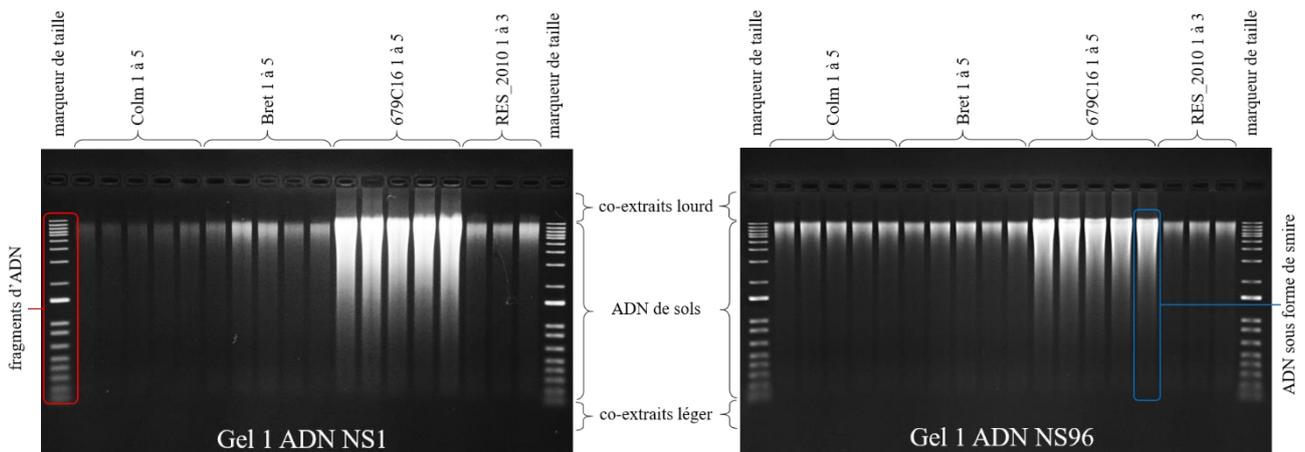


Figure 17 : Résultats obtenus pour les gels 1 des ADN propres NS1 et NS96.

Tout d'abord, la figure 17 montre que tous les échantillons d'ADN propres sont très smireux ce qui signifie que les ADN sont fragmentés en de multiples tailles différentes, ils sont donc abimés et ceci peu importe le kit de purification utilisé. Ceci permet donc de conclure que l'état dit qualitatif des ADN propres n'est pas différent d'un kit à l'autre, le kit en plaque ne dégrade donc pas plus les ADN que le kit habituel. Ensuite, la figure 17 permet de comparer l'intensité des smires pour un ADN issu d'un même sol en fonction du kit de purification. Dans notre cas, les ADN purifié par le nouveau kit en plaque NS96 ont la même intensité que l'ADN correspondant purifié avec le kit habituel NS1. L'intensité étant similaire pour les deux kits, cela signifie que deux ADN propres NS1 et NS96 issu d'un même sol ont une concentration en ADN proches. Toutefois, cette comparaison reste indicative et ne donne pas une valeur de concentration pour effectuer une comparaison précise, il est donc nécessaire d'effectuer des analyses quantitatives. De plus, les échantillons ayant une intensité marquée serait donc plus concentré en ADN que les échantillons d'intensité plus modéré, c'est le cas du sol 679C16 que l'on peut voir en figure 17 ainsi que le sol Jura non représenté ici. Enfin, il est intéressant de comparer les résultats obtenus pour les 5 répétitions d'ADN issus d'un même sol afin de vérifier la répétabilité ou non des kits. Pour les deux kits de purification utilisés, la répétabilité entre les 5 répétitions de chaque sol est

vérifiée puisque l'intensité des échantillons au sein d'un quintupla est identique. Les 5 répétitions d'ADN propres issus d'un même sol ont donc un comportement identique et une concentration en ADN probablement proche, que ce soit avec le kit NS1 ou le kit NS96.

L'électrophorèse en gel d'agarose avec coloration au BET a donc permis de visualiser globalement l'état et le comportement des échantillons en vérifiant une cohérence entre deux ADN issus d'un même échantillon mais purifiés par un kit différent. Elle a permis aussi de vérifier la correspondance entre les 5 répétitions montrant une répétabilité au sein d'un même échantillon de sol pour chacun des kits de purification. Toutefois, il s'agit d'une méthode uniquement qualitative, il est donc nécessaire de réaliser d'autres analyses complémentaires notamment quantitatives puisque qualitativement il n'existe pas de grandes différences entre deux ADN de kits différents issus d'un même sol.

IV/ Dosages et analyses pour une quantification spécifique des ADN propres

1) Dosage fluorométrique pour une quantification spécifique des ADN propres

Ce dosage permet d'évaluer la quantité d'ADN extraite obtenue après purification. Le but ici étant de comparer les concentrations obtenues entre les deux kits testés pour les 5 répétitions des 10 échantillons de sols.

a) Principe

Le dosage est basé sur une relation de proportionnalité entre la quantité d'ADN bicaténaire et la fluorescence émise. En effet, cette méthode a pour principe de doser des ADN par fluorescence par le biais d'un fluorochrome qui ici est le *Quantifluor*. Cette molécule est un intercalant de l'ADN qui se lie spécifiquement dans la double hélice de l'ADN entre deux paires de bases voisines. Cela rend le dosage d'ADN très sensible, précis et spécifique à l'ADN bicaténaire (double-brins). Le *Quantifluor* est excité à une longueur d'onde de 485nm et émet à une longueur d'onde de 538nm. C'est le signal fluorescent émit à cette longueur d'onde qui sera détectée par le lecteur de plaque Infinite Pro 200 (TECAN) permettant de déterminer la concentration dans chaque échantillon grâce à la présence d'une gamme étalon d'ADN de phage lambda de concentrations connues.

b) Méthode

Le dosage est effectué en plaque optique de 96 puits (plan de plaque en [annexe 2](#)) dans laquelle on retrouve :

- Une gamme de 6 points d'ADN de phage lambda prête à l'emploi de concentrations 2 à 0,016 ng/μL ; le tout en trois répétitions
- Un témoin négatif permettant d'évaluer le bruit de fond, lui aussi en trois répétitions
- Un étalon d'ADN de thymus de veau, en trois répétitions, de concentration connue à 2ng/μL servant à la validation technique
- Les échantillons d'ADN à doser préalablement dilués au 1/5 dans de l'EUP afin de rentrer dans la gamme
- Un fluorochrome, Quantifluor, à diluer à raison de 25μL dans 5mL de tampon pour une plaque complète de 96 puits ajouté à la fin dans tous les puits en quantité égale ([annexe 1 point de sécurité](#))

Tableau de composition des différents types de puits :

	ADN à doser	Point de gamme	Témoin négatif	Etalon
Solution d'ADN à quantifier	5 µL préalablement diluée			
Solution de gamme		50 µL		
Etalon à 2 ng/µL				5 µL
Diluant (tampon TE 1X)	45 µL		50 µL	45 µL
Solution fluorochrome dilué	50µL			

Tableau 3 : Composition des puits.

La lecture de la fluorescence a lieu dans un lecteur de plaque (Infinite pro 200-TECAN) directement dans la plaque au travers d'un film optique. Les données sont collectées par un logiciel nommé Magellan qui :

- Trace la droite étalon à partir des valeurs connues de la gamme
- Vérifie les paramètres de validité de l'analyse à savoir :
 - ✓ $r^2 > 0,990$ pour la gamme moyenne (trois répétitions)
 - ✓ concentrations obtenues pour les 3 puits étalon comprises entre 1 et 3 ng/µL car l'incertitude de cette méthode de dosage est de 1ng/µL
 - ✓ échantillons compris dans la gamme

Dans le cas où ses critères ne sont pas respectés, le logiciel affiche un message d'erreur.

- Calcule les concentrations des échantillons à partir de l'équation de la droite étalon

Les données sont exportées dans un fichier Excel directement utilisable pour comparer la quantité d'ADN purifiée avec le kit habituel *NucleoSpin® Soil* - Macherey-Nagel par rapport au kit *NucleoSpin® Soil 96* - Macherey-Nagel, à partir d'un même échantillon d'ADN de brut de sol.

c) Résultats : comparaison des concentrations d'ADN par kit pour un même échantillon

Le dosage a été effectué en deux fois, c'est-à-dire une analyse pour les 50 ADN purifiés avec le kit NS1 et une analyse avec les 50 ADN purifiés avec le kit NS96.

- Validation de l'analyse :

La figure 18 montre la droite étalon obtenue pour la plaque NS1. Pour les deux plaques, les critères d'acceptabilité sont respectés, les analyses sont donc valides. Les concentrations des échantillons comprises dans la gamme peuvent donc être utilisées pour la comparaison des kits ainsi que pour la préparation des ADN de la qPCR. Ceux n'étant pas compris dans la gamme sont testés en changeant la dilution soit en les diluants au 1/10 pour ceux ayant une fluorescence supérieure à la gamme ou en les mettant purs pour ceux étant inférieurs.

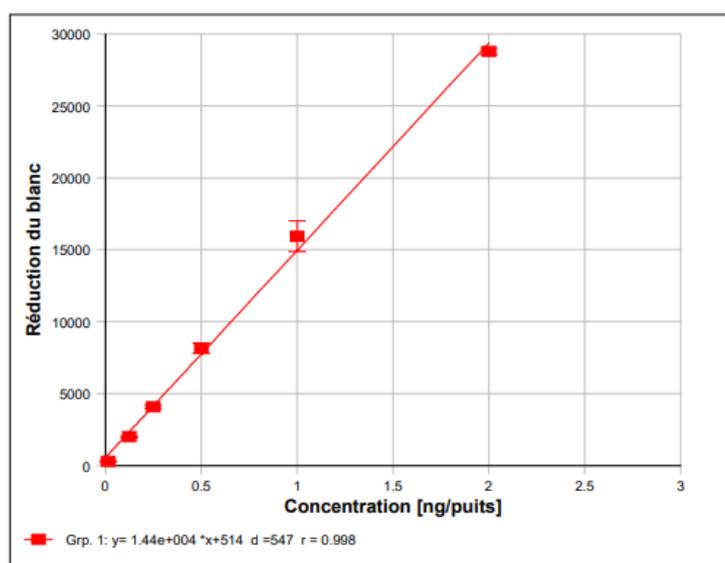


Figure 18 : Courbe d'étalonnage obtenue pour la plaque NS1.

- Comparaison des concentrations entre les 2 kits NS1 et NS96 :

Le graphique en [figure 19](#) représente la concentration moyenne en ADN (ng/μL) obtenue pour chacun des 10 sols à partir des 5 répétitions. Sont aussi calculés les écarts types de chaque sol toujours à partir des 5 répétitions correspondantes.

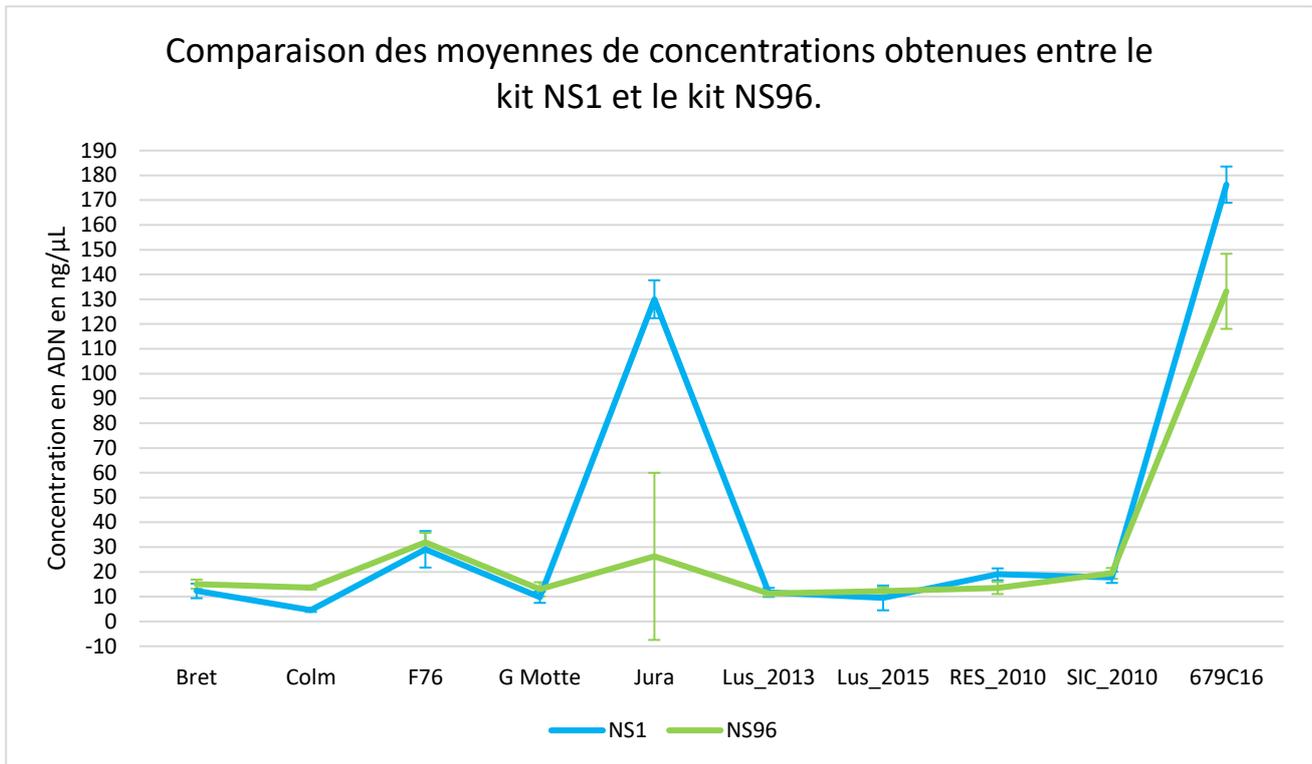


Figure 19 : Graphique représentant les concentrations en ADN pour chaque sol, par dosage fluorométrique.

On remarque que pour la plupart des sols, les concentrations obtenues suivent les mêmes tendances entre le kit NS1 et le kit NS96. A part pour le sol Jura, les écart-types obtenus entre les 5 répétitions pour chaque sol sont faibles. Si l'on compare les concentrations obtenues, on remarque que trois sols ont des concentrations en ADN supérieures à 20ng/μL peu importe le kit utilisé. Ces trois sols sont en réalité des sols très riches en matières organiques puisqu'il s'agit de sols de forêts pour F76 et Jura et l'échantillon 679C16 qui est une tourbe (zone humide propice aux développements microbiens).. Or la matière organique est riche en carbone qui est la source principale d'énergie et d'éléments nutritifs aux micro-organismes, d'où une concentration en ADN plus importante. Toutefois, les sols Jura et 679C16 se démarquent plus avec les deux concentrations en ADN les plus élevées.

Pour ce qui est du sol 679C16, le graphique met en évidence une différence entre la concentration moyenne obtenue avec le kit NS1 et le kit NS96. En effet, ce sol possède une concentration en ADN purifié légèrement plus importante avec le kit NS1. Par ailleurs, l'écart type notamment pour le kit NS96 est plus important sur ce sol que pour les 8 autres sols vu précédemment. Cet écart-type plus important provient du fait que nous sommes sur un sol contenant de nombreux acides humiques, or ces acides humiques sont co-extraits et rendent la purification aléatoire en termes de quantité et de qualité d'ADN, ce qui explique la différence entre les répétitions. Toutefois, cela ne signifie pas qu'il y aura un impact sur les analyses moléculaires comme la qPCR.

La plus grande différence de concentration entre les deux kits est pour le sol Jura où la concentration obtenue avec le kit NS1 est au moins 4 fois supérieure à celle avec le kit NS96. Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour le kit NS96 on a élué l'ADN avec 3 x 30μL au lieu des 2 x 30μL utilisés pour le kit NS1, automatiquement, la concentration en ADN du kit NS96 sera plus faible que celle du kit NS1, il aurait fallu déterminer la quantité qui elle doit être identique. Par ailleurs, le sol Jura est un sol de forêt, très riche en micro-organismes, mais aussi en acides humiques. Or ces acides humiques peuvent boucher la colonne et comme pour le kit NS96 la vitesse de centrifugation est plus faible, l'éluat peut être moins efficace car certains acides nucléiques peuvent rester coincés sur la membrane. Le graphique permet aussi de visualiser que l'écart type de ce sol avec le kit NS96 est largement plus important que celui avec le kit NS1. Si on regarde plus particulièrement les concentrations obtenues pour chaque répétition du sol Jura, on se rend compte qu'une valeur du kit NS96 (répétition 1) rend l'écart-type si grand. On peut donc supposer que cette valeur différente est issue

d'une erreur de manipulation, soit un mauvais pipetage, soit une colonne bouchée ou encore un défaut lors de la purification.

Concentration pour le sol Jura	Kit NS1	Kit NS96
Repet 1	139	86,5
Repet 2	132	9,14
Repet 3	129	11,9
Repet 4	118	13,1
Repet 5	132	10,6

Il est bon de noter que le test de ce kit a été effectué avec un large choix diversifié de sols dont certains qui sont des sols dits « complexes », c'est-à-dire qu'ils contiennent beaucoup d'acides humiques et rendent donc la purification aléatoire, c'est le cas des sols Jura et 679C16. La plupart des sols analysés habituellement par la plateforme sont moins complexes que ces deux sols, on obtiendrait donc des résultats similaires aux sols Bret, Colm, F76, G Motte, Lus_2013, Lus_2015, RES_2010 et SIC_2010. Hormis pour les sols complexes, on obtient des résultats similaires entre le kit NS1 et le kit NS96, il a donc peu de différence entre les deux kits, mais on ne peut pas conclure avec seulement ces résultats, il faut donc pousser l'analyse plus loin afin d'obtenir une comparaison précise sur d'autres critères comme la qualité des ADN au Nanodrop et la densité microbienne par qPCR.

2) Vérification de la qualité des ADN propres au Nanodrop

a) *Principe et méthode*

Cette méthode a pour principe de quantifier mais surtout de vérifier la qualité des ADN purifiés par spectrophotométrie à l'aide d'un appareil nommé Nanodrop 2000 (figure 20). Celui-ci mesure l'absorbance de la solution déposée à plusieurs longueurs d'ondes pour produire un spectre allant de 220 à 350nm. C'est la mesure à 260nm, qui permet de calculer la concentration en ADN de la solution à l'aide de la loi de Beer-Lambert. En effet, elle donne une proportionnalité entre l'absorbance à 260nm et la concentration en ADN, qui absorbe à cette longueur d'onde selon la formule suivante :

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

avec A = l'absorbance (sans unité) ; ε = coefficient d'absorption molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) ; l = largeur de solution traversée (cm) et C = concentration de la solution en molécule cible ici ADN ($mol \cdot L^{-1}$).



Figure 20 : Nanodrop 2000.

La méthode utilisée est la suivante :

- Faire un blanc tous les 10 échantillons : déposer avec une pipette 1 μL de tampon d'éluion sur la cellule optique, fermer l'appareil, lancer le blanc via le logiciel associé.
- Mesure d'un échantillon : déposer avec la même pipette que pour le blanc 1 μL d'échantillon sur la cellule optique, fermer l'appareil, lancer la mesure. Répéter l'opération pour chaque échantillon, une fois tous les échantillons passés, exporter les données dans un fichier Excel.

Le faible volume utilisé constitue un problème de représentativité et donc de précision d'un échantillon de type ADN de sol d'après l'expérience de la plateforme. En effet, les co-extraits restant après purification d'ADN absorbent à 260 nm et peuvent surestimer la concentration mesurée. C'est pourquoi, seul le dosage fluorométrique sera utilisé pour estimer la concentration des ADN obtenus. Cette méthode sert principalement

à vérifier la qualité des ADN propres à l'aide des rapports 260/280nm et 260/230nm qui sont directement calculés par l'appareil. Ils permettent de connaître le niveau de pureté de l'ADN par comparaison aux normes stipulant que :

- un rapport 260/280nm doit être compris entre 1,8 et 2,0 (rapport ADN/protéines)
- un rapport 260/230nm doit être entre 2,0 à 2,2 (rapport ADN/sels minéraux et composés chimiques)

Si ce n'est pas le cas, notamment s'il est inférieur, cela signifie que l'ADN n'est pas totalement pur mais cela révèle la présence de contaminants ou des résidus de tampon. Dans le cas d'ADN de sols, ces intervalles d'acceptabilité des rapports donnés par les normes sont très souvent non-respectés puisqu'il est très difficile de débarrasser un ADN de sol de tous les contaminants malgré une purification. En effet, les co-extraits et notamment les acides humiques ont la capacité de se lier aux acides nucléiques, leur élimination totale revient à une absence d'ADN.

b) Résultats : comparaison de la qualité des ADN purifiés selon le kit utilisé

Pour chaque échantillon, l'appareil génère un spectre d'absorbance aux trois longueurs d'ondes mesurées. Les spectres sont similaires pour chaque échantillon et seule la courbe de l'échantillon RES_2010 répétition 3 est représentée en [figure 21](#).

Ce spectre montre que l'absorbance d'environ 1,5 à 260nm est caractéristique de l'ADN et est plus importante que pour les protéines à 280nm (inférieur à 1). Pour une longueur d'onde de 260nm, le profil attendu montre une absorbance à presque 6 ce qui est bien supérieur à celle obtenu pour tous nos échantillons. Cela signifie qu'il y a moins d'ADN dans nos échantillons puisque d'après la loi de Beer Lambert l'absorbance à 260nm est proportionnelle à

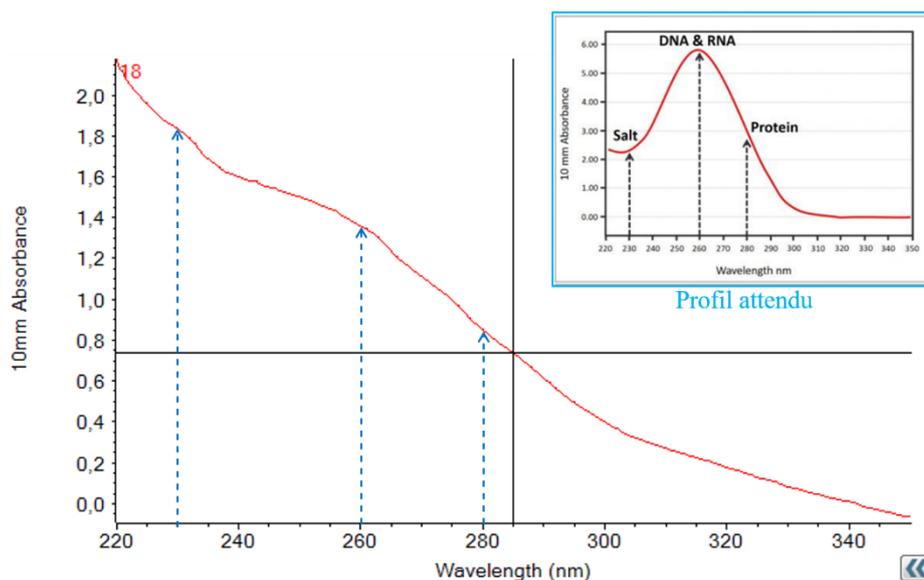


Figure 21: Exemple de courbe/spectre des ADN propres en comparaison du profil attendu.

la concentration en ADN. A 230 nm, la valeur attendue devrait être inférieure à 2,5 alors qu'ici (et pour tous les échantillons), la valeur est supérieure à 1,8. Enfin, à 280nm la valeur obtenue est environ à 0,9 alors que le profil attendu est à 2,5. Les absorbances à 230 et 280nm mettent en évidence la présence de résidus du tampon riche en sels utilisé lors de la purification de l'ADN comme le thiocyanate de guanidine pour 230nm et de protéines pour 280nm. Toutefois, lorsque l'on compare ses valeurs avec les valeurs attendues on remarque qu'elles sont toutes deux inférieures au maximum autorisé et les résultats sont similaires pour les deux kits. En effet, comme le montrent les graphiques de comparaison des ratios que ce soit avec le kit de purification habituel ou le kit en plaque, les résultats ont des tendances identiques.

Les ratios 260/230 et 260/280 des valeurs d'absorbances sont des indicateurs de pureté des échantillons d'ADN. Le fournisseur du Nanodrop recommande des valeurs de référence appelées normes. Les deux graphiques suivants représentent les valeurs obtenues pour les 10 sols traités en 5 répétitions avec les deux protocoles de purification (NS1 et NS96).

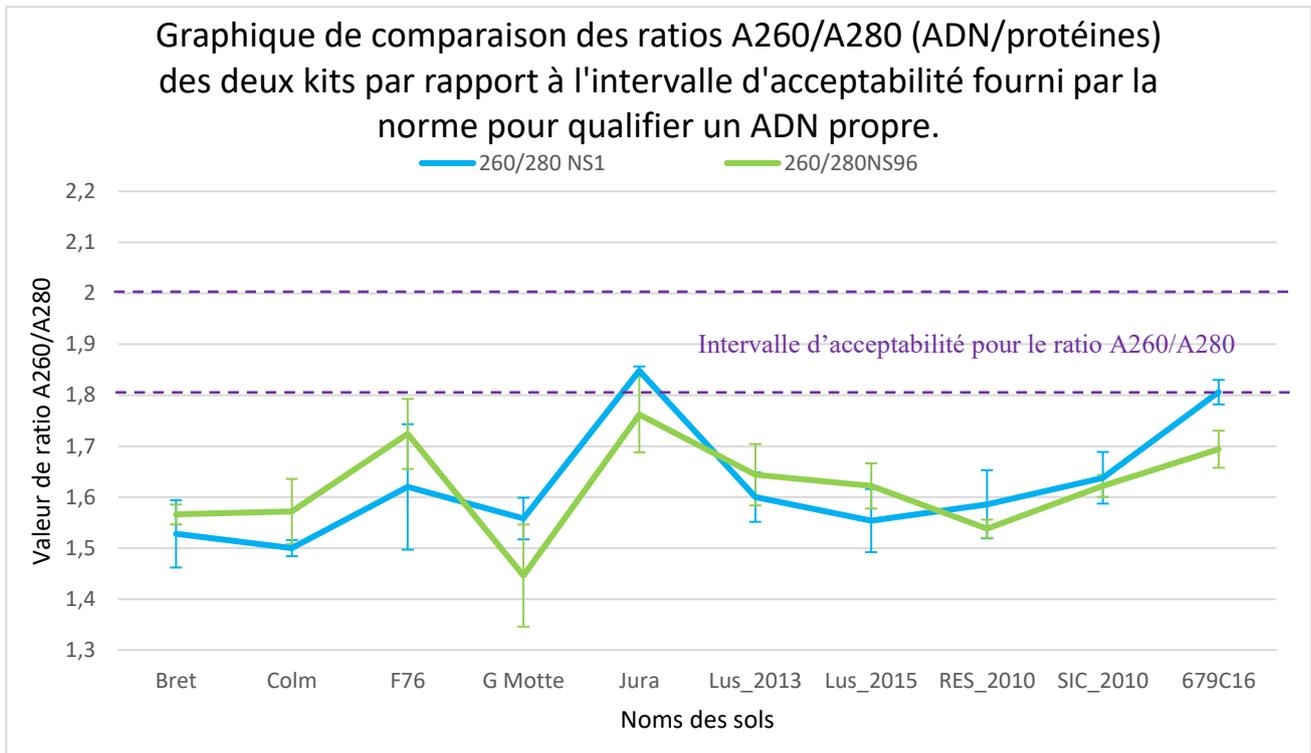


Figure 22 : Graphique représentant le ratio A260/A280.

Quel que soit le protocole, les courbes se suivent avec la même tendance et les écart-types sont faibles (inférieurs à 0,2). Cela met en évidence que seuls les échantillons Jura purifié par le kit NS1 et 679C16 purifié par le kit NS1 sont de justesse dans l'intervalle d'acceptabilité pour ce qui est du ratio A260/A280. Pour tous les autres sols, ils sont inférieurs à l'intervalle donné par la norme.

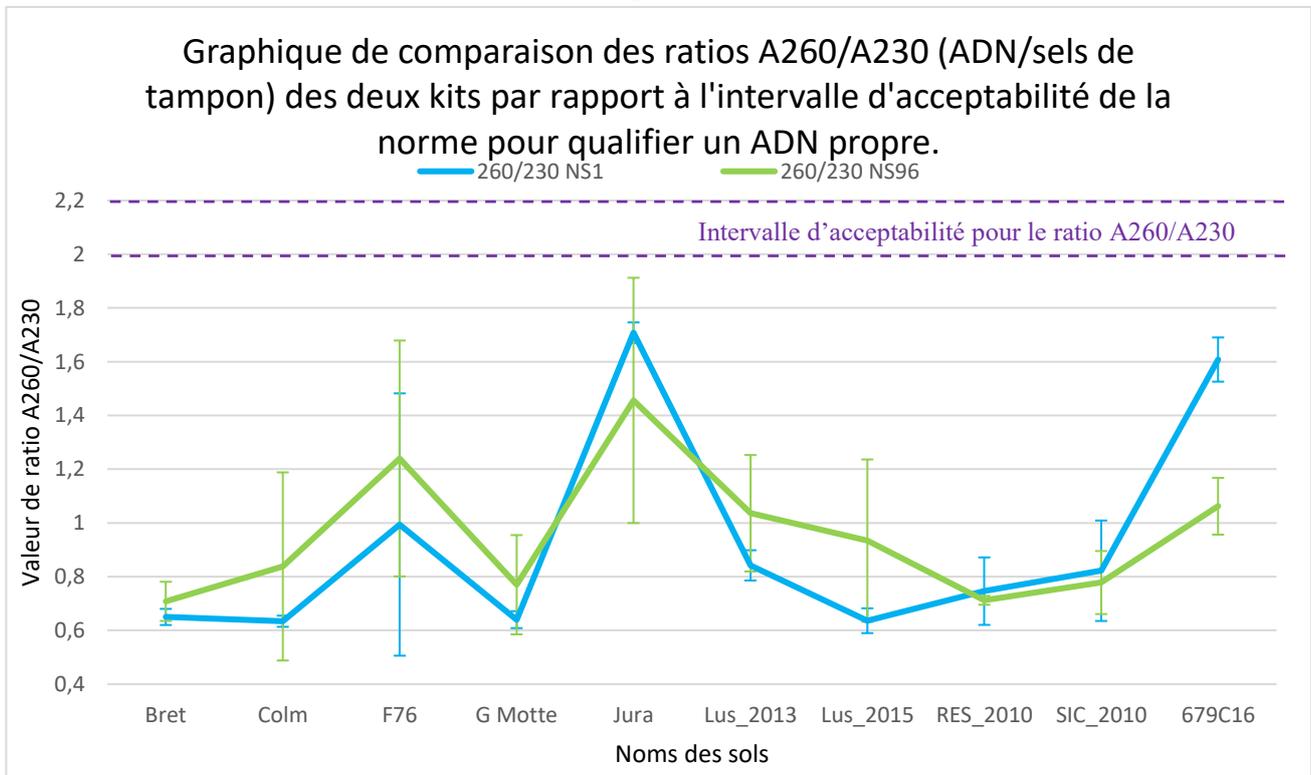


Figure 23 : Graphique représentant le ratio A260/A230.

Ici, les courbes suivent la même tendance pour les deux kits mais les écart-types sont légèrement plus grands probablement car la mesure au Nanodrop provient de 1 µL ce qui donne une large marge d'erreur. En ce qui concerne les ratios A260/A230, tous les sols ont des ratios inférieurs à ceux attendus par la norme, car les deux

kits utilisent une solution tampon à base de Thiocyanate de Guanidine qui absorbe à 230nm et caractéristique des spectres obtenus. L'essentiel pour ses deux graphiques est de comparer les résultats obtenus pour les deux kits et il est facilement observable que pour chaque ratio comparé, les ADN purifiés d'un même sol suivent globalement la même tendance peu importe le kit utilisé.

Par ailleurs, l'observation majoritaire pour tous les échantillons, NS1 et NS96, est que l'absorbance à 260nm n'est pas très élevée ce qui signifie qu'il y a une faible quantité d'ADN provoquant un écrasement de la courbe au lieu d'un pic résolu à 260nm. Cela explique aussi des valeurs de ratios bien inférieures aux normes qui sont basées sur des concentrations en ADN élevées, si les concentrations en ADN étaient plus importantes, les ratios seraient dans la norme. Les résultats sont similaires à ceux obtenus auparavant pour les autres échantillons traités par la plateforme et les ADN de sols étant très difficiles à purifiés, les impuretés pouvant être détectées à 230 et 280nm sont normales et ne gênent pas les autres analyses futures.

V/ Analyse de la qualité, de la fonctionnalité et de la composition des ADN propres par qPCR

La plateforme réalise des analyses de qPCR (Polymerase Chain Reaction quantitative) afin de quantifier deux types de gènes d'intérêts qui sont les gènes ribosomiaux 16s spécifique aux populations bactériennes et 18s spécifique aux champignons. Ainsi peut être déterminé l'équilibre microbien par calcul du ratio du nombre de copies des gènes 18s/16s soit champignons/bactéries. Le but ici est de vérifier que les ADN purifiés par le kit NS1 et ceux purifiés par le kit NS96 ont le même équilibre microbien.

La qPCR est basée sur le même principe que la PCR en permettant une forte amplification d'une séquence spécifique d'un gène. Contrairement à la PCR, elle permet de quantifier en temps réel le produit amplifié (amplicon) grâce à une lecture en temps réel de la quantité d'amplicons.

1) Principe et méthode

a) La PCR en point final

La PCR s'effectue dans un thermocycleur et le processus se décompose en 4 étapes schématisées sur la [figure 25](#) qui sont :

- Etape 1 = dénaturation initiale des ADN présents : A cette étape, la température monte jusqu'à 95°C pendant 15 minutes pour que l'ADN bicaténaire soit séparé de manière à obtenir deux brins d'ADN monocaténaires. Cette montée en température permet aussi l'activation de certaines Taq polymérases, enzyme est essentielle à la PCR. Cette étape a lieu une seule fois au début de la PCR.
- Etape 2 = dénaturation de l'ADN : Les ADN sont placés entre 90 et 95°C pendant 15 à 30 secondes afin de séparer les ADN bicaténaires pour obtenir uniquement des ADN monocaténaires.
- Etape 3 = hybridation des amorces : Les amorces choisies sont spécifiques à une séquence de gène recherchée et se fixent spécifiquement sur cette séquence de façon complémentaire grâce à la présence d'un tampon qui apporte le pH optimal à la Taq et de magnésium qui est un cofacteur essentiel au fonctionnement de la Taq. Cette étape se déroule entre 55 et 65°C pendant 30 à 45 secondes ce qui correspond à la température optimale de fixation des amorces (T_m) et dépend de leurs séquences en nucléotides.

- Etape 4 = élongation : Cette étape se fait à une température de 72°C pendant 30 secondes. Il s'agit de l'étape de synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire grâce à la Taq polymérase qui va fixer de façon spécifique les nucléotides libres appelés dNTP.

Les étapes 2 à 4 constituent un cycle PCR, ce cycle sera répété n fois souvent entre 35 et 40 fois pour obtenir à la fin 2ⁿ copies du gène d'intérêt (avec n le nombre de cycles effectués) comme le montre la [figures 24](#).

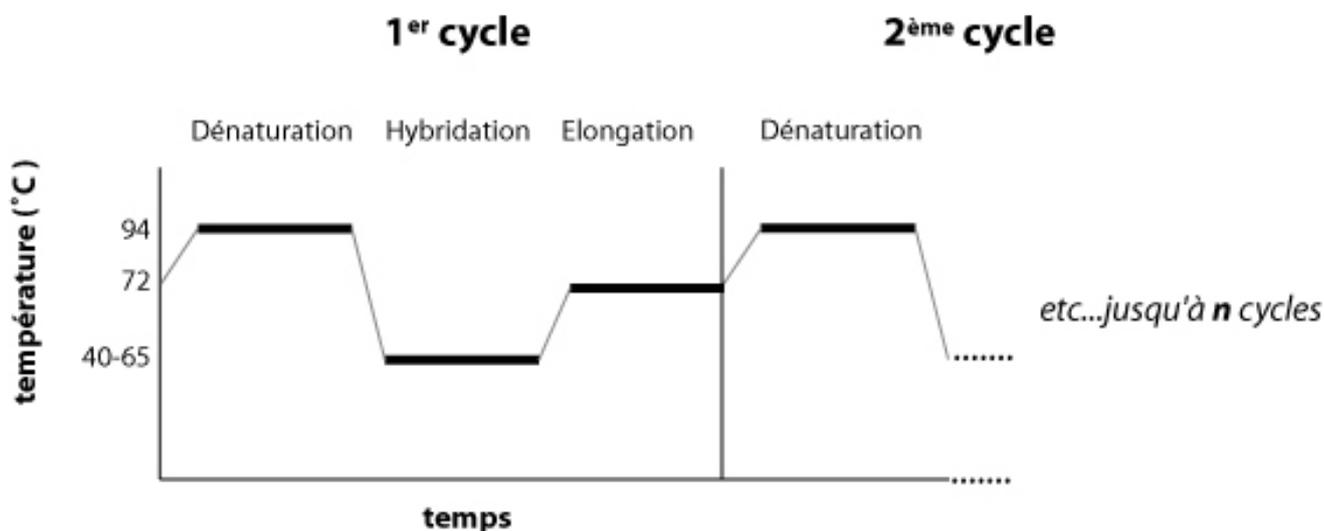


Figure 24 : Graphique de la température en fonction du temps pour les étapes d'un cycle PCR classique.

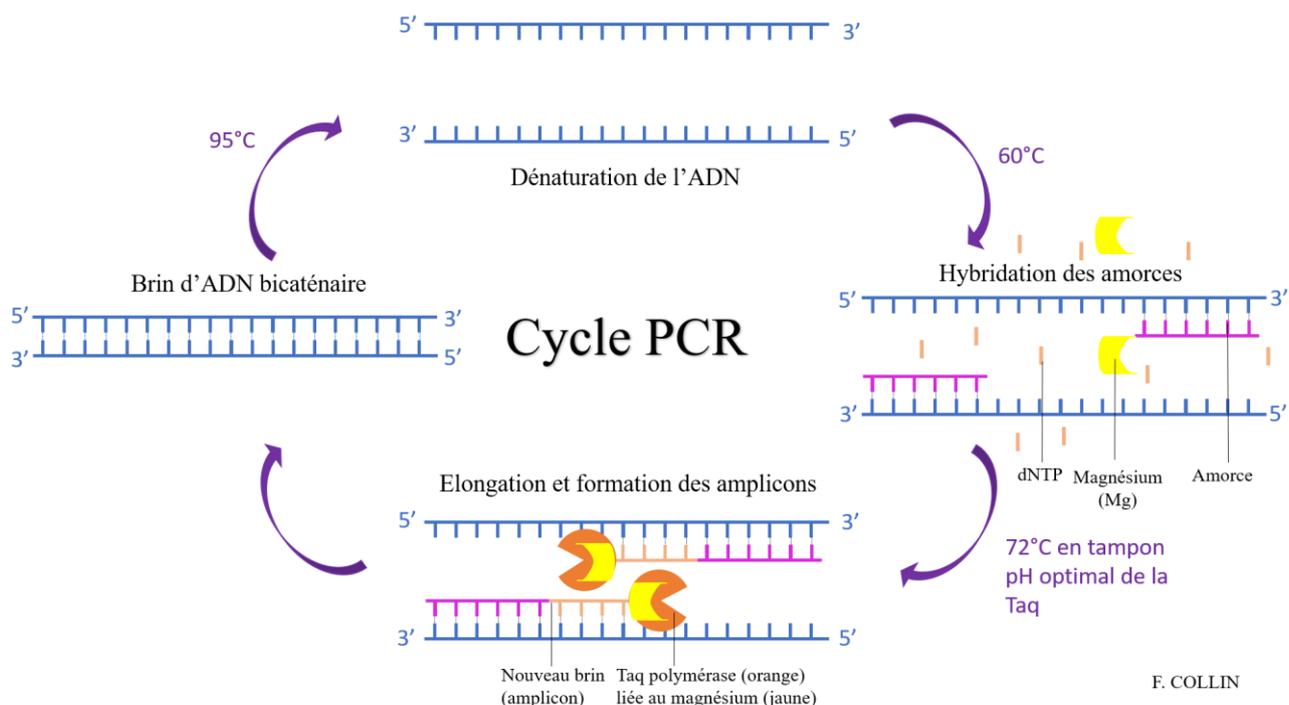


Figure 25 : Schéma de principe d'un cycle PCR classique.

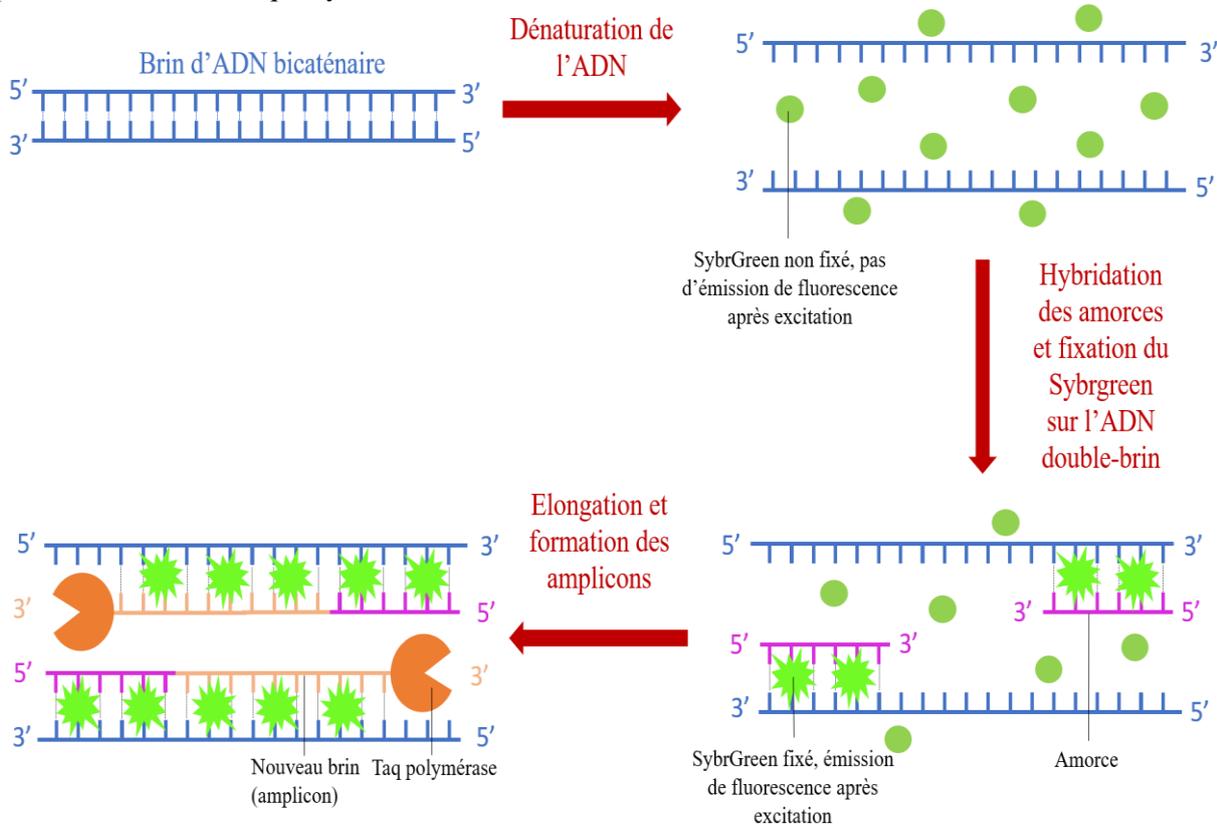
b) La PCR quantitative

Le suivi en temps réel de la quantité d'amplicons produits en PCR quantitative se fait grâce à une fluorescence mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification. Il existe deux grandes catégories de fluorescence en PCR quantitative :

- soit une quantification avec une sonde fluorescente Taqman qui va se fixer spécifiquement à la séquence d'ADN cible
- soit une quantification à l'aide d'un fluorochrome spécifique à l'ADN. Cette méthode est moins onéreuse mais reste moins spécifique au gène recherché.

Dans notre cas, il s'agit d'une quantification à l'aide d'un fluorochrome qui est le SybrGreen (annexe point de sécurité) qui est ajouté à l'échantillon avant l'amplification.

Comme le montre la [figure 26](#), le SybrGreen se fixe dans l'ADN à l'état de double brin et fluoresce sous une longueur d'onde d'excitation permettant sous la longueur d'onde d'émission de mesurer la quantité d'amplicons produits à la fin de chaque cycle.



F. COLLIN

Figure 26 : Schéma de principe de la qPCR SybrGreen.

Le logiciel associé délivre des courbes d'amplification pour chacun des puits. La [figure 27](#) montre les courbes d'amplification de la plaque 1 en gène 16s. La courbe d'amplification est divisée en trois phases :

- Le bruit de fond : les gènes cibles sont en quantité insuffisante pour être distinctement identifiés et quantifiés
- La phase exponentielle ou linéaire : Elle permet une relation de proportionnalité entre la quantité de produit formé et la fluorescence mesurée. Ainsi, en début de phase, l'appareil calcule un seuil, le threshold, qui est une limite de détection minimale qui élimine le bruit de fond et se situe en début de phase linéaire, dans notre cas il est égal à 0,2. Le croisement de la courbe d'amplification et du threshold

permet d'obtenir une valeur quantitative qui est le résultat brut de l'analyse de qPCR, c'est le Cycle threshold (Ct).

- La phase plateau, limite d'amplification dû à une consommation totale des composants de la PCR (amorces, nucléotides...)

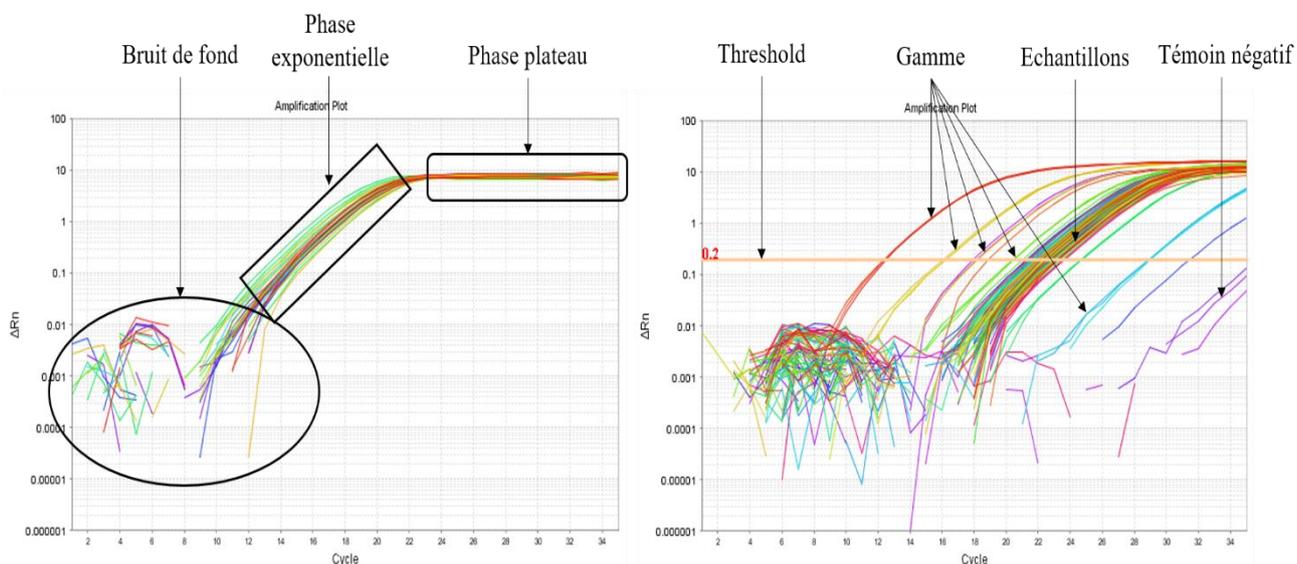


Figure 27 : Exemple des courbes d'amplification et traçage du threshold avec le logiciel.

Lors de la qPCR par quantification absolue, on utilise une gamme étalon de concentrations connues qui permet de tracer une droite étalon représentant le nombre de copies en fonction du Ct qui permettra ainsi de calculer le nombre de copies de gènes dans chaque puits à partir du Ct.

L'amplification suit une loi exponentielle de telle manière qu'à la fin de chaque cycle la quantité d'amplicons est de 2^n pour ce qui est de notre analyse, $n = 35$ cycles.

c) Méthode de la qPCR

La préparation d'une qPCR se fait en 5 étapes :

- Dilution des ADN à testés à $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ à partir des concentrations fluorométriques
- Préparation des ADN à tester et de la gamme : la gamme 16s est constituée de 6 points allant de $0,5 \times 10^8 \text{ copies}/\mu\text{L}$ à $0,5 \times 10^3 \text{ copies}/\mu\text{L}$ pour la gamme 18s, ils vont de $0,5 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$ à $0,5 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$. Enfin on dispose d'un étalon G4 à $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ servant à valider la plaque. Tous les ADN sont déposés à raison de $2 \mu\text{L}$ par puit.
- Préparation des témoins : ADN de référence G4 à $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dont on connaît le résultat ainsi que témoin négatif avec de l'eau pour vérifier la non-contamination de la plaque
- Préparation du mix qPCR dont la composition est donnée après, il est déposé à raison de $13 \mu\text{L}$ par puit pour la gamme les témoins et les échantillons.
- Run thermique : une fois le mix et les ADN ajoutés dans la plaque, celle-ci est placée dans le thermocycleur, l'amplification débute et dure environ 2h

Le mix étant facilement contaminable, il est préparé sous une station PCR après décontamination aux UV avec un flux d'air durant 15 minutes. En effet, elle permet de s'affranchir de potentielles contaminations puisqu'elle est dédiée à ces préparations et n'est jamais en contact avec de l'ADN.

Composition du mix qPCR :

Composants		Rôles	Volumes pour 1 puit de 13 μ L (μ L)	Quantité finale dans le puit
Amorces		Séquences de nucléotides monocaténares, connues et spécifiques du gène d'intérêt en encadrant sa séquence pour permettre le fonctionnement de la Taq polymérase	1,5 (pour chacune des deux amorces)	1 μ M (pour chacune des deux amorces)
T4 apligene		Enzyme permettant de limiter l'action d'inhibiteurs en protégeant la Taq	0,75	0,500 μ g
Master Mix Sybrgreen Takyon	Taq polymérase	Enzyme thermostable qui synthétise le nouveau brin d'ADN complémentaire	7,5	1X
	dNTPs	Bases azotées A (adénine), T (thymine), C (cytosine) et G (guanine) qui seront utilisées pour synthétiser le nouveau brin		
	Tampon	Apporte un pH optimal pour l'activité de la Taq		
	Magnésium (à ajouter dans mix pour la 18s)	Cation (ion de charge positive) qui est un cofacteur enzymatique, il est essentiel au fonctionnement de la Taq		
Eau		Diluant	1,75	-

Tableau 4 : Composition du mix pour la réalisation d'une qPCR.

Une fois tous les composants ajoutés, la plaque est scellée avec un film optique permettant la mesure de fluorescence avant d'être placée dans l'appareil (StepOne Plus – Applied Biosystem) relié au logiciel StepOne Software pour suivre en temps réel l'évolution de la qPCR et récupérer les résultats sous forme de fichier Excel.

2) Résultats obtenus pour nos échantillons d'ADN propres des deux kits

Avant d'analyser les résultats des échantillons, il est nécessaire de valider l'analyse. Cette validation se fait, après avoir placé un threshold à 0,2, en étudiant les trois critères principaux suivants :

- ✓ Linéarité de la gamme étalon : $r^2 > 0,990$
- ✓ L'efficacité de PCR : si l'équation de PCR est respectée, chaque cible est doublée à chaque cycle, l'efficacité doit être comprise entre 85 et 110% soit une pente entre - 3,10 et - 3,74
- ✓ Les Ct des échantillons doivent être compris dans les points de la gamme, si certains sont en dehors, ils sont écartés

D'autres points peuvent être intéressants à vérifier :

- ✓ Les Ct des témoins et la référence interne :

Ct moyen	Etalon G4	Point 1 ^E 8/puit	Point 1 ^E 7/puit	Point 1 ^E 3/puit	Point 1 ^E 2/puit	NTC
16S	16	7		23		<25
18S	21/22		10		28	<23 ou undetermined

- ✓ Les valeurs de Tm +/- 0,5°C

	16s	18s
Dimères	66	66
Gamme	85	85
Echantillons	88	85

- ✓ Les courbes de NTC : s'assurer que la Tm soit identique à celle des amorces et échantillons, les NTS doivent être à au moins 2 cycles du dernier échantillon amplifié
- ✓ La ligne du Rox n'est pas trop épaisse sinon cela signifie un mauvais pipetage
- ✓ L'homogénéité de la gamme et la répétabilité entre les répétitions
- ✓ Les échantillons doivent bien avoir été amplifiés pour être analysés sinon ils sont écartés

Validation de notre analyse : exemple pour les trois critères principaux de la plaque 1 en qPCR 16s (figure 28) :

- $r^2 = 0,997$ ce qui est bien supérieur à 0,990, la linéarité de la gamme est donc correcte
- L'efficacité de PCR est de 89,89% ce qui est bien compris dans l'intervalle de validité
- Les Ct des échantillons (en verts) présentés sur la figure 38 sont compris entre le premier et le dernier point de la gamme (en rouges)

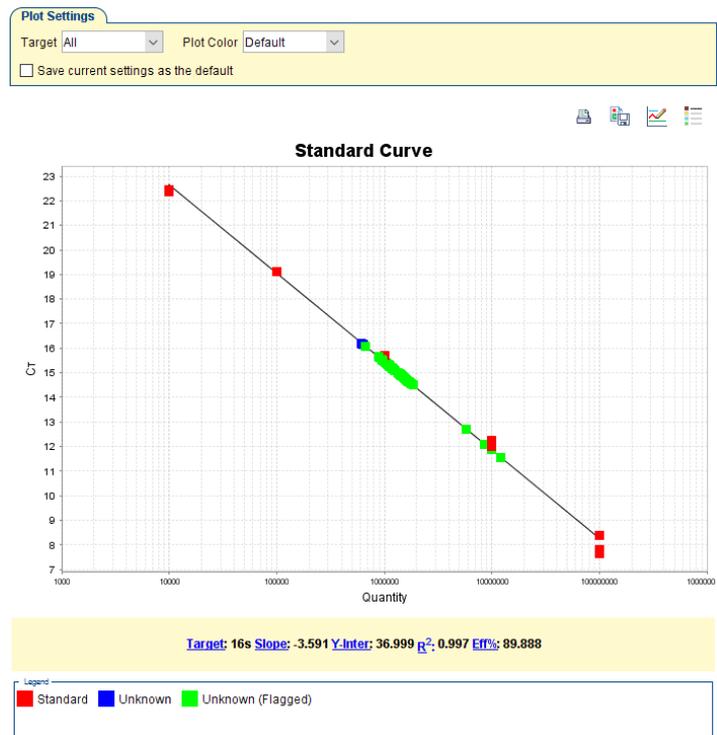


Figure 28 : Validation de la plaque 1 pour le gène 16s.

Les trois critères principaux sont validés, on peut donc valider la plaque. Il en est de même pour la deuxième plaque 16s et les deux plaques 18s, l'analyse est donc validée, les résultats peuvent donc être exploités hormis la répétition 1 G Motte en NS96 où il n'y a pas d'amplification, l'ADN est toujours jaune il y a donc des contaminants qui n'ont pas été éliminés, il aurait fallu effectuer une deuxième purification comme pour le même échantillon en kit NS1, mais le kit contenait une seule plaque, elle ne pouvait donc pas être réutilisée. Pour ce sol l'étude est menée sur les 4 autres répétitions. L'annexe 4 montre les résultats bruts obtenus pour les Ct de chaque échantillon en 16 et 18s puis les nombre de copies de gènes correspondants et le ratio nombre copies 18s/16s x 100.

Le graphique en [figure 29](#) représente la moyenne des rapports du nombre de copies 18s/ nombre de copies 16s x 100 pour le kit NS1 en bleu et le kit NS96 en vert.

On remarque tout d'abord que tous les sols, hormis F76 et Jura ,ont globalement les mêmes tendances pour les deux modes opératoires. De plus, leurs écart-types sont relativement faibles pour les 5 répétitions.

En revanche pour les deux sols F76 et Jura le rapport 18s/16s x 100 est différent entre les deux kits.

Pour Jura, le kit en plaque NS96 a un rapport supérieur à NS1, ce qui signifie qu'il y a une proportion plus importante de gènes 18s dans l'ADN extrait que de 16s et donc qu'il y a une population bactérienne moins importante que celle fongique pour le kit en plaque.

Pour F76, le rapport du kit habituel NS1 est largement supérieur à celui du kit en plaque, ce qui signifie qu'il y a une proportion plus importante de gènes 16s dans l'ADN extrait que de 18s et donc qu'il y a une population bactérienne plus importante que celle fongique pour le kit en plaque.

Par ailleurs, pour ces deux sols, les écart-types sont beaucoup plus élevés. Cette différence de rapport et ces grands écart-types en purification en plaque peuvent s'expliquer par le fait que la centrifugation étant plus faible, elle rend la purification plus aléatoire sur certains sols. De plus, ces deux sols sont forêts, onc riches en ADN mais aussi en acides humiques, il est possible que ceci influence la purification et la rend aléatoire.

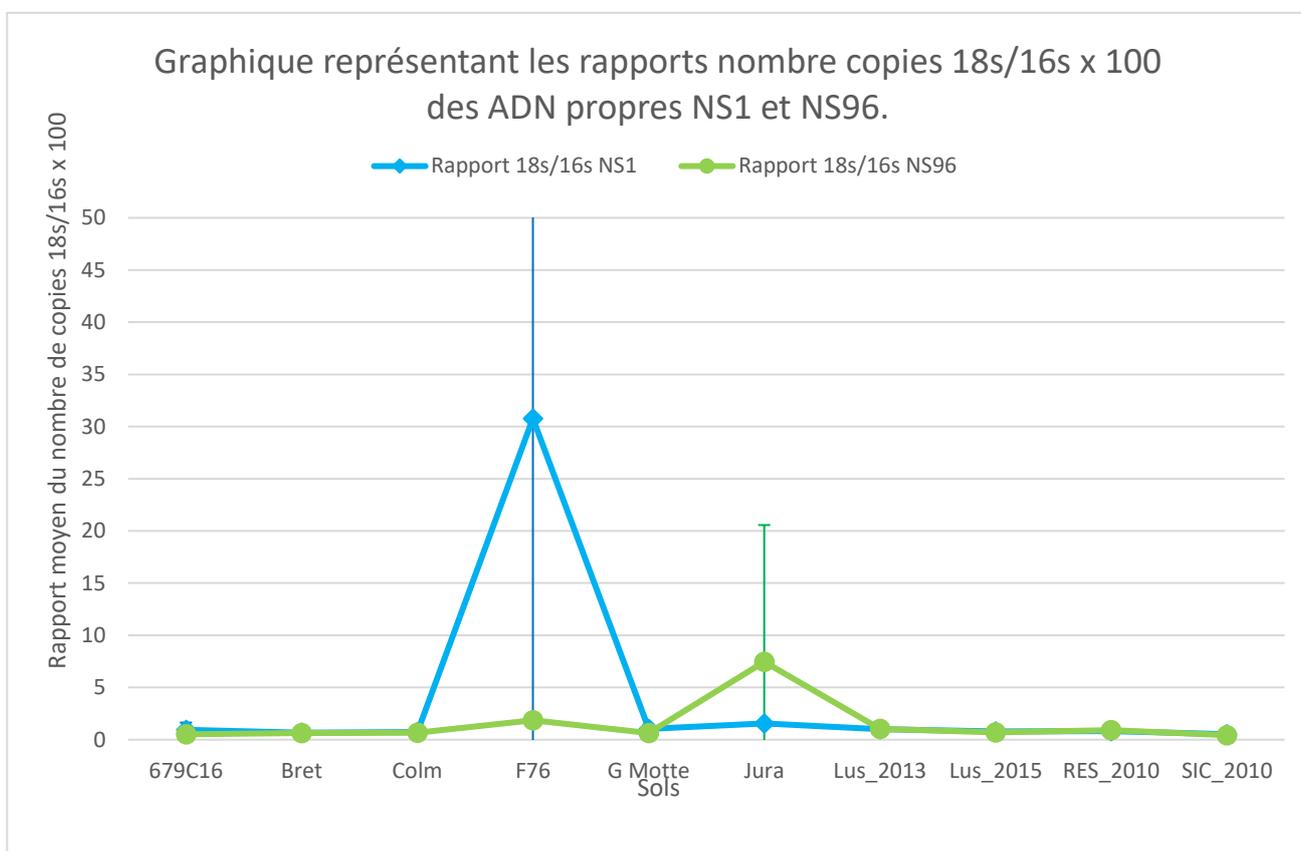


Figure 29 : Graphique représentant les rapports 18s/16s.

Afin de mieux comprendre les différences obtenues pour les deux sols, ainsi que pour intensifier la comparaison des deux kits de purification avant de statuer si le kit en plaque peut être utilisé au sein de la plateforme, il nécessite de nouvelles perspectives d'études. En effet, habituellement la plateforme réalise d'autres analyses moléculaires notamment la PCR suivie d'un séquençage de l'ADN ce qui permet d'étudier la diversité des échantillons d'ADN de sols. Cette méthode d'analyse demande non seulement un investissement mais aussi plus de temps, cette manipulation sera donc traitée post-stage durant l'été 2021.

Conclusions

I/ Conclusion scientifique

Pour rappel, la plateforme GenoSol possède un référentiel de données où sont inscrits toutes les manipulations et résultats obtenus pour les échantillons de sols testés. Toutefois, la plateforme fait face à des demandes d'analyses de plus en plus nombreuses, il est donc nécessaire de trouver des moyens permettant d'augmenter le débit d'analyses sans interférer les résultats. La purification d'ADN de sols est essentielle, mais celle-ci est très chronophage, mon stage s'inscrit donc dans une veille technologique afin d'augmenter ce débit de purification.

En effet, il consiste en une veille technologique comparant deux protocoles de purification théoriquement identiques mais dont les vitesses de centrifugations sont différentes ce qui pourrait créer un biais avec les échantillons. L'étude est donc effectuée sur 10 échantillons de sols en 5 répétitions chacun et ceux pour chaque protocole de purification nommé NS1 pour le kit habituel mono-colonne et NS96 pour le kit en plaque.

Une fois les 50 échantillons (10 sols x 5 répétitions) obtenus pour le kit NS1 ainsi que les 50 échantillons issus des mêmes sols obtenus pour le kit NS96, la comparaison entre les deux kits s'est déroulée en plusieurs étapes.

Tout d'abord, un dosage fluorométrique ainsi qu'un dosage spectrophotométrique ont été effectués afin de vérifier d'une part la qualité et d'autre part la quantité d'ADN extrait pour chacun des deux modes opératoires. Dans les deux cas, il y a peu de différence d'un protocole à l'autre, la qualité de l'ADN reste similaire peu importe le kit utilisé. La plupart des sols ont des concentrations en ADN assez proches hormis les sols très riches en micro-organismes tels que les sols de forêt qui ont une légère différence due à la présence de nombreux acides humiques pouvant boucher la membrane contenue dans la colonne de purification.

Ensuite, la vérification a porté sur l'impact du nouveau protocole au niveau des indicateurs microbiens habituels. Cette vérification est effectuée par qPCR par mesure de la densité microbienne en s'intéressant à deux gènes caractéristiques, le gène 16s pour les bactéries et le gène 18s pour les champignons. Le but ici étant de vérifier que cette densité microbienne (bactéries et champignons) soit identique pour les deux kits. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les deux kits ont globalement des résultats similaires avec des écarts-types faibles hormis pour deux sols qui sont des sols de forêt riche en acides humiques. Ces acides humiques rendent la purification aléatoire en bouchant la colonne ce qui explique la différence de rapport 18s/16s x 100 ainsi que les forts écarts-types.

Les manipulations effectuées durant ce stage ne montrent pas de grandes différences entre le kit habituel et le kit en plaque. Il faut donc envisager l'étude de nouvelles perspectives avant de conclure réellement sur l'utilisation ou non du kit en plaque pour les futures analyses de la plateforme. En effet, la plateforme souhaite évaluer la diversité microbienne plus précisément en réalisant une PCR suivie d'un séquençage des ADN. De plus, il est intéressant de comparer le coût de revient des deux protocoles ainsi que le gain de débit analytique. Si tous ses critères sont validés, la plateforme pourra mettre en production le mode opératoire avec le kit NucleoSpin Soil 96.

II/ Conclusion personnelle

J'ai eu la chance d'effectuer mon stage au sein de la plateforme GenoSol de l'UMR Agroécologie à l'INRAE qui est un grand centre de recherche français. Ce stage m'a permis d'accéder aux laboratoires de la plateforme et ainsi utiliser les nombreuses machines de dernière génération. Etant originaire de la campagne, je me sens concernée par l'Agroécologie et grâce à ce stage, j'ai pu en apprendre plus sur ce domaine qui m'intéresse.

Le stage m'a aussi permis de découvrir le milieu du travail en laboratoire. Mon projet m'a permis d'être confrontée à la réalité du travail, les inconvénients que l'on peut rencontrer notamment en mettant en place un nouveau protocole, les problèmes techniques liés aux appareils utilisés. J'ai également eu la chance d'être totalement intégrée au travail de la plateforme en travaillant avec une base de données regroupant les résultats, en utilisant des applications spécifiques à la plateforme (gestionnaire des stocks des produits, commandes, fournisseurs). Comme la plateforme est certifiée ISO9001, j'ai pu apprendre à travailler en suivant des protocoles de qualité, en respectant les normes et en validant mes résultats par rapport à des référentiels de qualité. J'ai également été initiée à la sécurité, j'ai aussi appris le mode de gestion des déchets et j'ai pu découvrir l'entretien du matériel notamment des pipettes, des centrifugeuses...

Pour ce qui est du côté pratique, j'ai très vite appris à organiser et optimiser mon temps de travail. J'ai pris de l'assurance à la paillasse en gérant mon stress, j'ai pu faire preuve d'autonomie grâce à la confiance que l'on m'a très vite donnée. J'ai pu faire preuve de persévérance et je n'ai pas baissé les bras face aux difficultés techniques que j'ai pu rencontrer. Ce stage m'a permis d'appliquer mes connaissances théoriques et mettre en pratique les enseignements reçus depuis le début de ma formation de BTS et de pousser mes connaissances en découvrant de nouvelles techniques ainsi qu'en utilisant de nouveaux appareils. De nature beaucoup trop perfectionniste, j'ai parfois dû apprendre à revoir mes objectifs avant de juger mon travail insuffisant, qui au vu des résultats obtenus, était tout à fait satisfaisant. Le travail en laboratoire au sein de la plateforme est très agréable, les locaux sont spacieux et récents, le matériel est présent en grande quantité pour permettre à chacun de travailler dans de bonnes conditions.

Ce stage au sein de la plateforme m'a permis de travailler l'anglais technique lié au laboratoire en étudiant le nouveau protocole de purification à tester. J'ai également appris à mettre en œuvre ce mode opératoire anglais en me confrontant aux difficultés dues à la différence entre la théorie et la pratique.

Le stage m'a aussi beaucoup apporté humainement grâce à la bonne entente au sein de l'équipe m'ayant rapidement intégrée pour passer un stage dans une ambiance conviviale et plaisante. Le personnel du LADM fonctionne beaucoup en équipe, chacun participe aux tâches communes en faisant preuve d'entraide, ce qui pour moi est la clé pour le bon déroulement de la plateforme.

Participer à la vie de la plateforme GenoSol m'a confortée dans mon projet professionnel puisque j'apprécie le travail à la paillasse. Pour moi le fait d'exercer en laboratoire permet de toujours se remettre en question, d'acquérir de nouvelles compétences, de nouvelles connaissances et d'évoluer en même temps que les appareils que l'on utilise. Le domaine de l'Agroécologie est un domaine que j'ai aimé étudier et au sujet duquel j'aimerais approfondir davantage mes connaissances, ce que je vais notamment pouvoir faire cet été puisque j'ai obtenu un CDD au sein de la plateforme.

Annexes

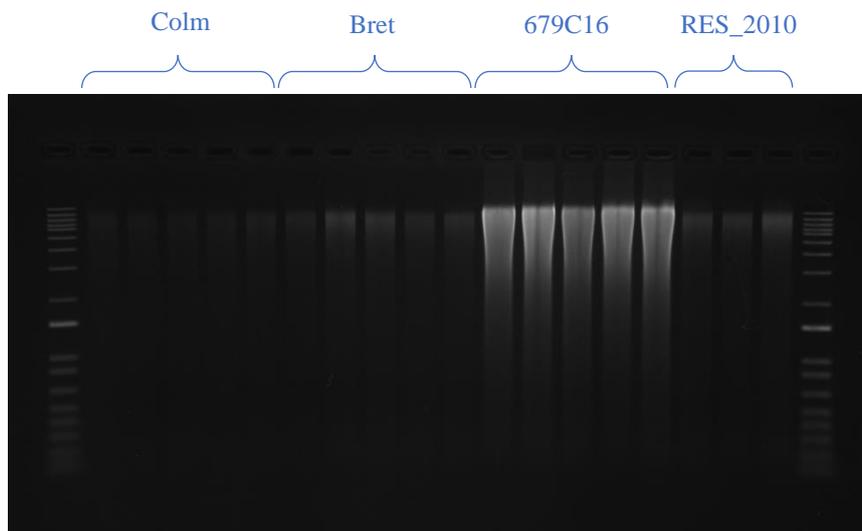
Annexe 1 : Point sécurité :

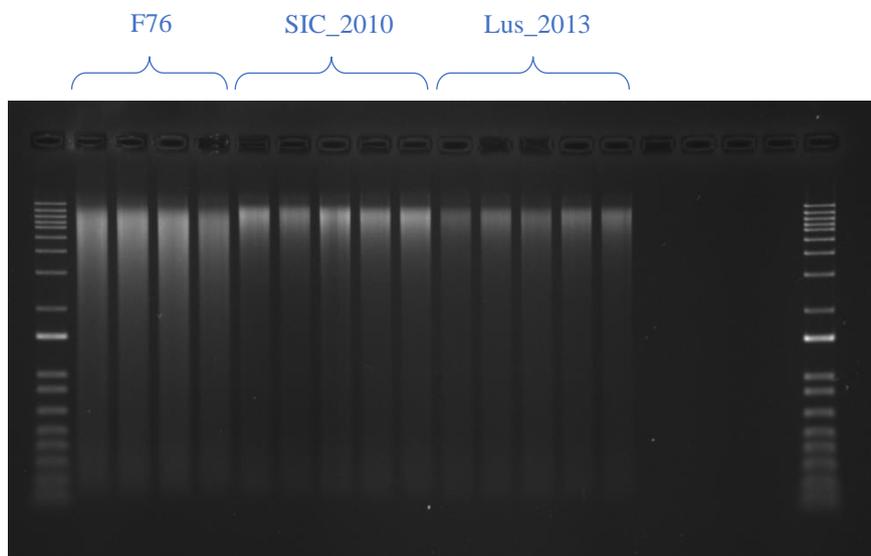
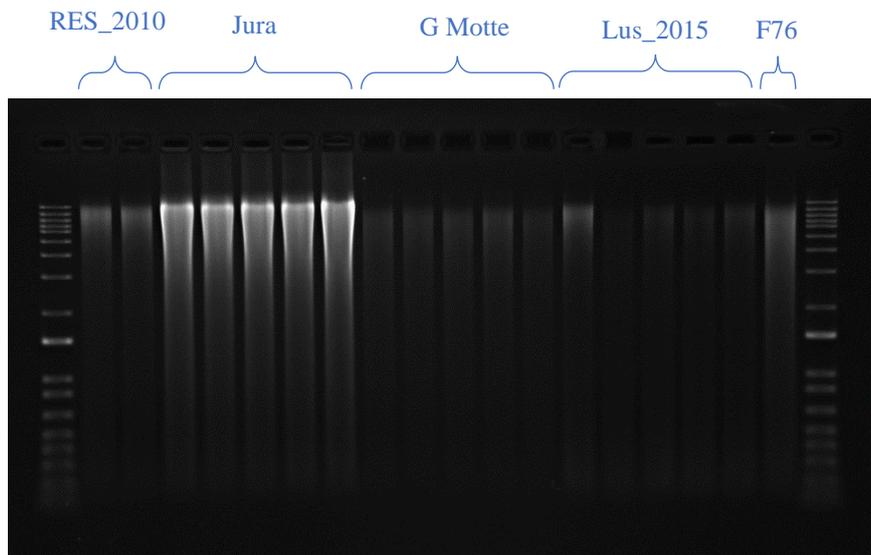
Produit	Etape	Danger	Protection (risque)
Billes de silice	Extraction d'ADN (préparation du tube de lyse)	Irritant 	Blouse, gants (contact cutané) Masque anti-poussières (inhalation) Lunettes (contact oculaire)
Tris (Trisma Base, Tris[hydroxyméthyl]aminométhane)	Extraction d'ADN (préparation du tube de lyse)	Irritant 	Blouse, gants (contact cutané)
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)	Extraction d'ADN (préparation du tube de lyse)	Irritant 	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires)
SDS Sodium Dodecyl Sulfate	Extraction d'ADN (préparation du tube de lyse)	Irritant 	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires)
Acétate de potassium	Extraction d'ADN (déprotéinisation)	Irritant 	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires)
Isopropanol	Extraction de l'ADN (précipitation ADN)	  Irritant, inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires) Travail sous sorbonne
Ethanol	Extraction de l'ADN (lavage de l'ADN) Purification	  Irritant, inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires) Travail sous sorbonne
Solution SB Guanidinium thiocyanate 30-60%	Purification (les deux kits)	Irritant 	Blouse, gants (contact cutané)
Solution SW1 Guanidine hydrochloride 36-50% + Isopropanol	Purification (les deux kits)	  Irritant, inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires) Travail sous sorbonne
Solution SW2 Ajout d'éthanol	Purification (les deux kits)	  Irritant, inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaires) Travail sous sorbonne (lors de l'ajout dans la solution SW2 du kit)

Quantifluor/picogreen	Dosage d'ADN par fluorescence	Cancérogène, Mutagène, reprotoxique 	Blouse, gants (contact cutané) Travail sous hotte avec matériel dédié
BET Bromure d'éthidium	Coloration gel électrophorèse	Cancérogène, Mutagène, reprotoxique 	Blouse, gants, sur manches (contact cutané) Pièce spécial BET avec délimitation de zone souillée Sur chaussures (contamination par la pièce) Travail sous sorbonne Elimination des déchets spécifique
TBE (Tris + EDTA + Acide borique)	Electrophorèse en gel d'agarose	 Reprotoxique, corrosif, irritant	Blouse, gants (contact cutané) Travail avec du matériel dédié
SybGreen (Takyon)	qPCR	Cancérogène, Mutagène, reprotoxique 	Blouse, gants (contact cutané) Travail sous hotte aspirante spéciale PCR Travail avec du matériel dédié Elimination des déchets spécifique

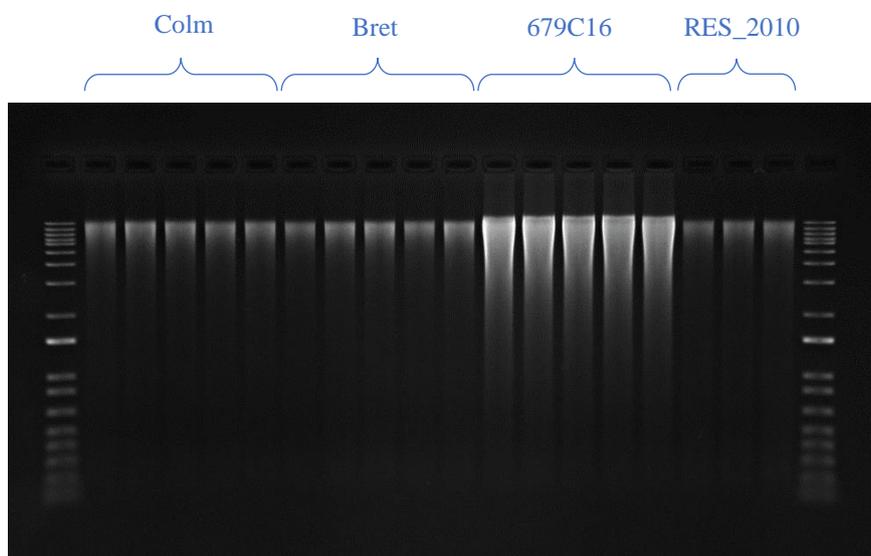
Annexe 2 : Résultats des trois gels NS1 et trois gels NS96 obtenus après électrophorèse et coloration au BET.

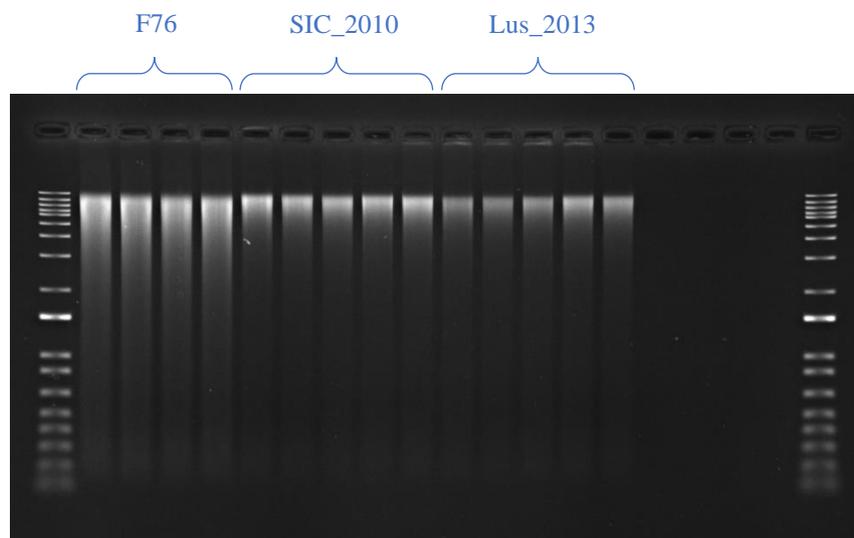
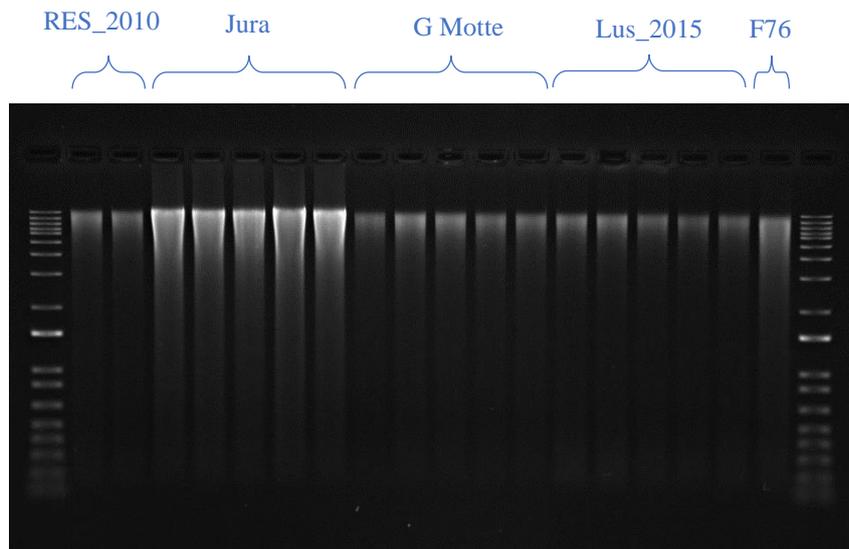
- ADN NS1 :





- ADN NS96 :





Annexe 3 : Plan de plaque pour le dosage fluorométrique ainsi que les résultats bruts et les concentrations en ADN obtenues :

Plan de plaque avec les points de gamme de concentrations connues, le blanc, le témoin en trois répétitions ainsi que les échantillons en une répétition (on réalise une plaque pour les ADN issus du kit NS1 et une pour ceux du kit NS96) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	st2	st2	st2	Colm_1	Bret_4	Res_2	Jura_5*	Lus5_3	Sic_1	Lus3_4*	Jura_2*	Lus3_5*
B	st3	st3	st3	Colm_2	Bret_5	Res_3	LGM_1	Lus5_4	Sic_2	Lus3_5*	Jura_3*	
C	st4	st4	st4	Colm_3	679_1	Res_4	LGM_2	Lus5_5	Sic_3	679_1*	Jura_4*	
D	st5	st5	st5	Colm_4	679_2	Res_5	LGM_3	F76_1	Sic_4	679_2*	Jura_5*	
E	st6	st6	st6	Colm_5	679_3	Jura_1*	LGM_4	F76_2	Sic_5	679_3*	Lus3_1*	
F	st9	st9	st9	Bret_1	679_4	Jura_2*	LGM_5	F76_3	Lus3_1*	679_4*	Lus3_2*	
G	blanc	blanc	blanc	Bret_2	679_5	Jura_3*	Lus5_1	F76_4	Lus3_2*	679_5*	Lus3_3*	
H	témoin	témoin	témoin	Bret_3	Res_1	Jura_4*	Lus5_2	F76_5	Lus3_3*	Jura_1*	Lus3_4*	

Les puits avec * contiennent des échantillons testés une nouvelle fois en changeant le taux de dilution (au 1/10 pour les * et purs pour les *).

Tableaux des données brutes données par le logiciel Magellan après réduction du blanc :

NS1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	28800	29000	28600	1690	3040	5120	34000	2850	6390	-29,7	26600	29800
B	17200	15200	15400	2140	4500	6810	3580	2310	5700	-28,7	26100	
C	8570	7910	7990	1670	40600	6600	3430	3160	6240	41600	23900	
D	4190	4050	3980	1710	38800	5760	3450	5930	4950	36200	26600	
E	2050	1950	1980	1930	37000	38300	4000	10600	5030	36100	21200	
F	265	324	246	3420	34200	36100	2230	10100	-13,7	35200	24400	
G	-7,67	10,3	-2,67	5160	31700	34300	5750	10600	-21,7	33300	21000	
H	2720	2850	2880	4220	5680	34600	2200	7430	-25,7	28000	25100	

NS96	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	35100	33300	32100	5410	5500	5980	31500	4950	8240	5820	2440	22500
B	19400	18700	18300	5770	6660	5010	3920	4050	7410	5030	2990	
C	10600	9740	9420	5590	37700	6340	5960	4980	7680	22700	3180	
D	5340	5120	4940	5070	36900	5270	6290	10200	7130	27900	2730	
E	2740	2440	2490	5390	38100	33200	5240	12900	6270	25000	19700	
F	330	298	287	5160	38100	30400	4620	11100	4810	21000	19000	
G	-7,67	20,3	-12,7	5720	36300	32000	5370	10700	4480	22600	18700	
H	3700	3610	3520	6420	4270	31700	5310	12800	4670	15700	22200	

Les données écrites en rouges et en oranges correspondent à des mesures de fluorescence hors gamme, les rouges sont trop élevées, les échantillons sont donc testés ensuite en prédiluant les ADN au 1/10 (données en bleu) tandis que les oranges sont trop faibles, les ADN sont donc testés pur (données en vert).

Tableaux de données des concentrations en ADN dans les échantillons, calculées par le logiciel Magellan :

NS1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,96	1,97	1,95	4,08	8,73	16	116	8,09	20,3	-1,88	132	14,5
B	1,15	1,02	1,03	5,64	13,8	21,8	10,6	6,24	18	-1,88	129	
C	0,558	0,512	0,518	4	139	21,1	10,1	9,18	19,8	209	118	
D	0,254	0,245	0,24	4,16	133	18,2	10,2	18,7	15,4	182	132	
E	0,107	0,099	0,102	4,9	126	131	12,1	35	15,6	181	10,2	
F	-	-	-	10,1	117	123	5,94	33,1	-1,83	176	11,8	
G	-	-	-	16,1	108	117	18,1	34,8	-1,86	166	10	
H	1,53	1,62	1,64	12,8	17,9	118	5,86	24	-1,87	139	12,1	

NS96	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	# 2.05	1,94	1,87	13,6	13,9	15,3	91,8	12,2	22,1	14,8	9,14	12,3
B	1,11	1,07	1,04	14,7	17,3	12,4	9,15	9,54	19,6	12,5	11,9	
C	0,583	0,531	0,512	14,1	110	16,4	15,2	12,3	20,4	126	13,1	
D	0,267	0,255	0,243	12,6	108	13,2	16,2	28	18,7	156	10,6	
E	0,112	0,094	0,097	13,5	111	96,7	13,1	36,1	16,2	140	10,9	
F	-	-	-	12,9	111	88,5	11,2	30,6	11,8	117	10,4	
G	-	-	-	14,5	106	93,3	13,5	29,5	10,8	127	10,3	
H	1,7	1,64	1,58	16,6	10,2	92,3	13,3	35,8	11,4	86,5	12,5	

Les concentrations obtenues en rouges et oranges ne sont donc pas prises en compte puisqu'elles sont hors gamme, elles sont remplacées respectivement par celles en bleu et vert.

Annexe 4 : Données brutes de la qPCR.

Code échantillon (sol_n°repet_kit)	Ct corrigé 16s	Nb copies 16s corrigé réel par ng d'ADN purifié	Ct corrigé 18s	Nb copies 18s corrigé réel par ng d'ADN purifié	Rapport nombre copies 18s/16s x 100
Colm_1_NS1	15,41	1,11E+06	22,76	6,33E+03	5,69E-01
Colm_2_NS1	15,34	1,16E+06	22,55	7,29E+03	6,28E-01
Colm_3_NS1	15,05	1,41E+06	22,17	9,49E+03	6,73E-01
Colm_4_NS1	14,85	1,61E+06	21,57	1,43E+04	8,87E-01
Colm_5_NS1	14,97	1,49E+06	21,75	1,27E+04	8,47E-01
Colm_1_NS96	14,51	2,02E+06	22,33	8,53E+03	4,22E-01
Colm_2_NS96	13,39	4,28E+06	22,68	6,66E+03	1,55E-01
Colm_3_NS96	16,34	5,98E+05	23,00	5,36E+03	8,97E-01
Colm_4_NS96	15,39	1,13E+06	21,87	1,17E+04	1,03E+00
Colm_5_NS96	14,82	1,64E+06	21,73	1,29E+04	7,84E-01
Bret_1_NS1	16,86	4,23E+05	24,37	2,08E+03	4,91E-01
Bret_2_NS1	15,19	1,28E+06	22,42	8,01E+03	6,23E-01
Bret_3_NS1	15,92	7,91E+05	22,39	8,13E+03	1,03E+00
Bret_4_NS1	15,37	1,14E+06	22,57	7,23E+03	6,33E-01
Bret_5_NS1	15,23	1,25E+06	22,57	7,18E+03	5,75E-01
Bret_1_NS96	15,47	1,07E+06	22,44	7,90E+03	7,39E-01
Bret_2_NS96	15,04	1,42E+06	22,33	8,53E+03	6,00E-01
Bret_3_NS96	14,97	1,49E+06	22,25	8,97E+03	6,02E-01
Bret_4_NS96	14,90	1,56E+06	22,27	8,85E+03	5,65E-01
Bret_5_NS96	14,85	1,61E+06	22,14	9,72E+03	6,03E-01
679C16_1_NS1	14,98	1,48E+06	22,49	7,62E+03	5,14E-01
679C16_2_NS1	14,80	1,67E+06	22,15	9,63E+03	5,78E-01
679C16_3_NS1	14,92	1,54E+06	22,57	7,20E+03	4,68E-01
679C16_4_NS1	16,07	7,14E+05	22,42	7,97E+03	1,12E+00
679C16_5_NS1	15,10	1,37E+06	20,58	2,85E+04	2,08E+00
679C16_1_NS96	14,66	1,84E+06	22,30	8,69E+03	4,73E-01
679C16_2_NS96	15,46	1,07E+06	22,86	5,89E+03	5,49E-01
679C16_3_NS96	14,37	2,23E+06	22,04	1,04E+04	4,68E-01
679C16_4_NS96	14,59	1,92E+06	22,07	1,02E+04	5,29E-01
679C16_5_NS96	14,78	1,69E+06	22,34	8,47E+03	5,00E-01
RES_2010_1_NS1	15,13	1,34E+06	21,88	1,16E+04	8,61E-01
RES_2010_2_NS1	15,45	1,08E+06	22,73	6,46E+03	5,97E-01
RES_2010_3_NS1	15,28	1,21E+06	22,04	1,04E+04	8,59E-01
RES_2010_4_NS1	14,68	1,81E+06	21,63	1,38E+04	7,64E-01
RES_2010_5_NS1	15,11	1,36E+06	21,73	1,29E+04	9,48E-01
RES_2010_1_NS96	14,88	1,58E+06	21,72	1,29E+04	8,19E-01
RES_2010_2_NS96	14,91	1,55E+06	21,46	1,55E+04	9,99E-01
RES_2010_3_NS96	14,78	1,69E+06	21,29	1,74E+04	1,03E+00
RES_2010_4_NS96	14,77	1,70E+06	21,62	1,39E+04	8,16E-01
RES_2010_5_NS96	14,87	1,59E+06	21,63	1,38E+04	8,67E-01
Jura_1_NS1	15,50	1,05E+06	21,55	1,46E+04	1,40E+00
Jura_2_NS1	15,30	1,19E+06	21,50	1,50E+04	1,26E+00
Jura_3_NS1	15,35	1,15E+06	20,81	2,42E+04	2,10E+00
Jura_4_NS1	15,36	1,14E+06	21,18	1,88E+04	1,64E+00
Jura_5_NS1	14,83	1,63E+06	20,87	2,33E+04	1,43E+00
Jura_1_NS96	14,20	2,48E+06	20,32	3,39E+04	1,37E+00
Jura_2_NS96	11,83	1,22E+07	13,50	3,76E+06	3,09E+01

Jura_3_NS96	12,24	9,21E+06	17,79	1,95E+05	2,11E+00
Jura_4_NS96	12,62	7,16E+06	18,69	1,04E+05	1,46E+00
Jura_5_NS96	12,13	9,93E+06	18,20	1,46E+05	1,47E+00
G Motte_1_NS1	15,59	9,81E+05	21,90	1,15E+04	1,17E+00
G Motte_2_NS1	14,46	2,09E+06	21,77	1,25E+04	5,98E-01
G Motte_3_NS1	15,44	1,09E+06	21,62	1,38E+04	1,27E+00
G Motte_4_NS1	14,29	2,35E+06	21,42	1,59E+04	6,77E-01
G Motte_5_NS1	14,64	1,86E+06	20,64	2,73E+04	1,47E+00
G Motte_1_NS96	#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!	#VALEUR!
G Motte_2_NS96	15,67	9,32E+05	23,27	4,45E+03	4,78E-01
G Motte_3_NS96	14,38	2,21E+06	22,33	8,52E+03	3,85E-01
G Motte_4_NS96	15,07	1,39E+06	22,22	9,17E+03	6,58E-01
G Motte_5_NS96	14,67	1,82E+06	21,20	1,85E+04	1,01E+00
Lus_2015_1_NS1	15,29	1,20E+06	22,17	9,51E+03	7,90E-01
Lus_2015_2_NS1	15,40	1,12E+06	22,31	8,59E+03	7,69E-01
Lus_2015_3_NS1	15,35	1,16E+06	22,11	9,90E+03	8,56E-01
Lus_2015_4_NS1	15,66	9,42E+05	22,50	7,59E+03	8,06E-01
Lus_2015_5_NS1	14,78	1,69E+06	21,79	1,23E+04	7,30E-01
Lus_2015_1_NS96	14,05	2,76E+06	22,22	9,20E+03	3,34E-01
Lus_2015_2_NS96	14,16	2,55E+06	22,67	6,73E+03	2,64E-01
Lus_2015_3_NS96	15,69	9,23E+05	22,70	6,60E+03	7,16E-01
Lus_2015_4_NS96	15,59	9,84E+05	22,43	7,91E+03	8,04E-01
Lus_2015_5_NS96	15,47	1,07E+06	21,49	1,51E+04	1,42E+00
F76_1_NS1	15,26	1,23E+06	20,67	2,68E+04	2,18E+00
F76_2_NS1	16,06	7,17E+05	15,36	1,04E+06	1,45E+02
F76_3_NS1	15,74	8,91E+05	21,09	1,99E+04	2,24E+00
F76_4_NS1	15,97	7,66E+05	21,48	1,53E+04	2,00E+00
F76_5_NS1	15,40	1,12E+06	20,56	2,88E+04	2,58E+00
F76_1_NS96	15,53	1,02E+06	21,01	2,12E+04	2,07E+00
F76_2_NS96	15,31	1,19E+06	20,84	2,37E+04	1,99E+00
F76_3_NS96	15,44	1,09E+06	21,35	1,67E+04	1,54E+00
F76_4_NS96	15,05	1,41E+06	20,43	3,14E+04	2,22E+00
F76_5_NS96	15,37	1,14E+06	21,27	1,77E+04	1,55E+00
SIC_2010_1_NS1	15,27	1,22E+06	22,47	7,72E+03	6,32E-01
SIC_2010_2_NS1	15,30	1,20E+06	23,06	5,14E+03	4,29E-01
SIC_2010_3_NS1	15,45	1,08E+06	22,70	6,61E+03	6,13E-01
SIC_2010_4_NS1	15,53	1,02E+06	23,35	4,20E+03	4,11E-01
SIC_2010_5_NS1	15,29	1,21E+06	22,72	6,48E+03	5,37E-01
SIC_2010_1_NS96	15,39	1,13E+06	22,73	6,47E+03	5,74E-01
SIC_2010_2_NS96	14,84	1,62E+06	22,65	6,83E+03	4,21E-01
SIC_2010_3_NS96	14,97	1,49E+06	23,02	5,27E+03	3,54E-01
SIC_2010_4_NS96	14,68	1,81E+06	22,61	6,99E+03	3,86E-01
SIC_2010_5_NS96	13,71	3,46E+06	21,54	1,46E+04	4,22E-01
Lus_2013_1_NS1	15,03	1,44E+06	21,63	1,38E+04	9,61E-01
Lus_2013_2_NS1	15,26	1,23E+06	21,91	1,13E+04	9,24E-01
Lus_2013_3_NS1	15,04	1,42E+06	21,89	1,15E+04	8,09E-01
Lus_2013_4_NS1	15,34	1,16E+06	21,73	1,29E+04	1,11E+00
Lus_2013_5_NS1	15,58	9,92E+05	21,78	1,24E+04	1,25E+00
Lus_2013_1_NS96	14,42	2,15E+06	21,24	1,81E+04	8,41E-01
Lus_2013_2_NS96	14,27	2,38E+06	20,78	2,47E+04	1,04E+00
Lus_2013_3_NS96	14,01	2,82E+06	21,10	1,99E+04	7,05E-01
Lus_2013_4_NS96	14,60	1,91E+06	20,91	2,26E+04	1,18E+00
Lus_2013_5_NS96	15,04	1,42E+06	21,10	1,98E+04	1,39E+00

Pour la répétition 1, du sol G Motte en NS96, l'analyse n'a pas fonctionné, il n'y a pas eu d'amplification, après observation de l'échantillon, l'ADN est toujours jaune, donc présence de contaminant gênant la qPCR, il aurait

donc été possible de purifier une deuxième cet échantillon comme c'était le cas pour le même échantillon en NS1, mais cela n'a pas été effectué puisque l'on possède une seule plaque du kit NS96 qui avait déjà été utilisée.

Annexe 5 : Sources.

Figure 1 : <https://www.inrae.fr/europe-international>

Figure 3 : <https://www6.dijon.inrae.fr/umragroecologie>

Figure 24 : <https://www.bioutils.ch/protocoles/10b-la-pcr-locus-pv92>



ATTESTATION DE STAGE

Conformément à l'article D. 124-9 du code de l'éducation, une attestation de stage est délivrée par l'organisme d'accueil à tout élève.

Ce document doit être complété et signé le dernier jour de la période de formation en milieu professionnel par un responsable autorisé de l'entreprise d'accueil et remis au stagiaire.

L'entreprise (ou l'organisme d'accueil) :

Nom : INRAE centre de Dijon - UMR Agroécologie - Plateforme GenoSol

Adresse : 17 rue Sully BP86510
21065 DIJON cedex

N° d'immatriculation de l'entreprise :

Représenté(e) par (nom) : Nathalie FLUNIER-JOLAIN Fonction : Présidente de centre

Atteste que l'élève désigné(e) ci-dessous :

Prénom : Fanny Nom : COLLIN

Classe : BTS 2 Bio AC

Date de naissance : 10/04/2001

Scolarisé(e) dans l'établissement ci-après :

Nom : Lycée LE CASTEL

Adresse : 22, rue Daubenton - 21033 DIJON CEDEX

Représenté par (nom) : Philippe VIOLLON en qualité de chef d'établissement

a effectué une période de formation en milieu professionnel dans notre entreprise ou organisme :

1^o année - Stage annulé par le lycée Le Castel pour raisons sanitaires.

2^o année du 23/11/2020 au 18/12/2020 et du 28/12/2020 au 22/01/2021

Soit une durée effective totale de : 8 semaines

Fait à Dijon, le 10/2/21.

Signature et cachet de l'entreprise ou de l'organisme d'accueil

Pour la Présidente de Centre
Mathieu JACQUES
D.E.A.