



HAL
open science

Impact des films de paillage et leur devenir sur la communauté microbienne des sols en contexte de maraîchage

Fanny Collin, Mélanie Lelievre

► To cite this version:

Fanny Collin, Mélanie Lelievre. Impact des films de paillage et leur devenir sur la communauté microbienne des sols en contexte de maraîchage. [Stage] INRAE Agroecologie. 2022. hal-03810040

HAL Id: hal-03810040

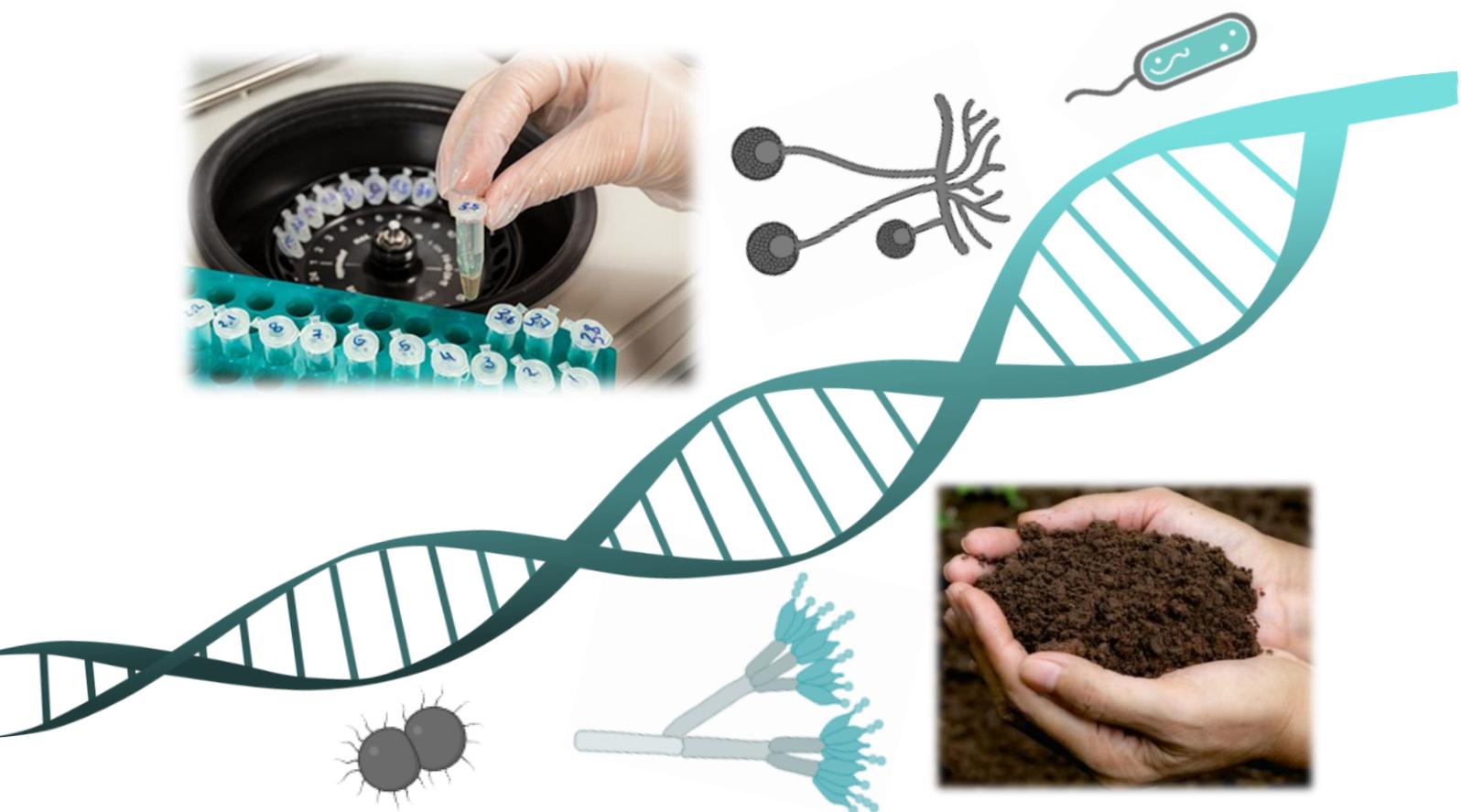
<https://hal.inrae.fr/hal-03810040>

Submitted on 11 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.

Impact des films de paillage et leur devenir sur la communauté microbienne des sols en contexte de maraîchage.



Fanny COLLIN



Licence Professionnelle Biotechnologies CTCBM
IUT Génie Biologique de Dijon
Université de Bourgogne-Franche-Comté,
du 15 septembre 2021 au 2 septembre 2022



Maître d'apprentissage : Mélanie LELIEVRE (melanie.lelievre@inrae.fr)
Plateforme GenoSol, UMR 1347 AgroEcologie
Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement
17 Rue Sully – 21065 Dijon Cedex

Remerciements

A l'issue de cette alternance, j'aimerais exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à Monsieur Philippe Mauguin, directeur général de l'INRAE ; à Madame Nathalie Munier-Jolain, présidente du centre INRAE de Dijon ; ainsi qu'à Monsieur Fabrice Martin-Laurent, directeur de l'Unité Mixte de Recherche AgroEcologie, pour m'avoir permis d'effectuer mon alternance au sein de leurs locaux.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur Samuel Mondy, responsable de la plateforme GenoSol, qui m'a accueillie au sein de son équipe et qui m'a présenté les enjeux scientifiques de mon projet. Je le remercie pour son implication et son investissement me permettant de pousser mes recherches plus loin et d'approfondir mes connaissances scientifiques.

Je tenais à adresser mes sincères remerciements à ma tutrice, Madame Mélanie Lelievre, responsable du Laboratoire d'Analyses et de Développements Moléculaires, pour m'avoir accordé de son temps et de sa patience pour me former et m'apporter de nouvelles connaissances nécessaires à cet apprentissage et qui pourront me servir tout au long de mon parcours professionnel. Je la remercie de m'avoir à nouveau fait confiance durant tout cet apprentissage ainsi que de l'autonomie qu'elle m'a laissée comme elle avait déjà pu le faire durant mon stage BTS. Je suis extrêmement reconnaissante de tout ce qu'elle a fait pour moi, le soutien qu'elle m'a apporté, ses conseils, son suivi tout au long de l'année. Grâce à elle, j'ai pu acquérir de nouvelles compétences, gagner en responsabilités, j'ai également pu suivre une formation en lien avec mes analyses qui me sera utile dans ma vie professionnelle. Merci à elle pour sa bonne humeur, sa gentillesse et mon intégration dans l'équipe ainsi que sa volonté de mener mon projet à bout pour atteindre mes objectifs et faire de cette alternance une réussite.

Je souhaite également exprimer mes remerciements à Madame Marion Yvin, Ingénieur d'étude à l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme, en charge du projet BIOMALEG, avec qui j'ai pu échanger tout au long du projet afin de lui exposer mes résultats et qui a su répondre à mes questions. Je la remercie également pour son accueil et sa gentillesse lors de mon déplacement sur le site de Auray-Lorient où nous avons réalisé ensemble divers prélèvements d'échantillons de sols de la campagne 2022.

J'en profite pour adresser mes remerciements à Madame Céline Faivre-Primot, responsable du Conservatoire de Ressources Génétiques de la plateforme, qui a pu m'apporter ses connaissances et son savoir sur le sol.

Je souhaite également remercier par la même occasion Mesdames Gwendoline Comment, Solène Perrin et Julie Tripied, toutes trois expérimentées à la paillasse et qui ont pu m'aider, me conseiller, m'apporter une aide technique et répondre à certaines de mes interrogations.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont pris part à mon projet d'alternance ainsi que ceux avec qui j'ai pu échanger et passer d'agréables moments : Anthony Auclair, Sophie Bourgeteau, Nicolas Chemidlin, Amélie Christel, Juliette Constans, Aurélien Cottin, Samuel Dequiedt, Maelle Deshoux, Christophe Djemiel, Marine Jourdain, Adrien Jugan, Pierre-Alain Maron, Florian Mercier, Daniela Mora, Lionel Ranjard, Sébastien Terrat, Alphonse Thiaw, Florian Vautrin, Cyril Zappelini.



Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

BIOMALEG : BIODégradabilité dans les sols des MATériaux de la filière LÉGumière

BMM : Biomasse Moléculaire Microbienne

CRG : Centre de Ressource Génétique

Ct : Cycle threshold

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

Eau UP : Eau Ultra-Pure

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

LADM : Laboratoire d'Analyses et de Développements Moléculaires

LIMS : Laboratory Information Management System

PBAT : PolyButylène Adipate Téléphtalate

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PE : Polyéthylène

PLA : PolyLactic Adic = acide polylactique

PVC : PolyVinyl Chloride = Polychlrure de vinyle

NGS : Next-Generation Sequencing (Nouvelle Génération de Séquençage)

QC : Quality control = contrôle de la qualité

qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative (en temps réel)

S (16S / 18S) : Svedberg

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Séquençage NGS : Next-Generation Sequencing (séquençage à haut-débit, séquençage nouvelle génération)

SIE : Système d'Information Environnemental

TBE : Tris Borate EDTA

Tris-HCl : Tris hydrochloride = 2-amino-2-hydroxyméthylpropane-1,3-diol hydrochloride

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : UltraViolet

Glossaire

ADN brut : échantillon d'ADN génomique extrait du sol avant purification. Il contient des co-extraits tels que des protéines, sucres, acides humiques souvent accrochés à l'ADN et néfastes pour les analyses.

ADN propre : échantillon d'ADN purifié, limpide, débarrassé des molécules indésirables et co-extraits responsables de la couleur brune du sol.

Amplicon : fragment d'ADN synthétisé lors d'une amplification par PCR.

Co-extraits : molécules issues de l'échantillon de sol accrochées à l'ADN telles que les acides humiques, protéines, sucres et macromolécules phénoliques.

Humus : couche supérieure du sol alimentée par la décomposition de la matière organique notamment par l'intervention des animaux et microorganismes.

Métagénomique : étude du génome des microorganismes de l'échantillon, du microbiome sans distinction d'espèces (bactéries, virus, champignons...).

Méta-protéomique : étude permettant l'identification et la quantification des protéines d'un échantillon.

Méta-transcriptome : ensemble des gènes et des fonctions exprimées par les différents microorganismes de l'échantillon.

P-value = valeur p : c'est la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle H0 (selon laquelle il n'y a pas de différence significative entre deux populations étudiées) à tort.

Sommaire

Remerciements	
Abréviations / Glossaire	
Sommaire	
I/ Introduction	1
<u>1)</u> Présentation du lieu d'apprentissage	1
<u>2)</u> Le sol, réservoir de la biodiversité et support de l'agriculture	2
<u>3)</u> Contexte scientifique du projet BIOMALEG et objectif du projet d'apprentissage	3
II/ Matériel et méthode	4
<u>1)</u> Mise en place du dispositif expérimental et prélèvements sur le terrain	4
<u>2)</u> Obtention de la matrice d'ADN métagénomique issue d'échantillons de sols	5
a. Extraction de l'ADN des sols.....	5
b. Purification des ADN bruts	6
c. Dosage fluorométrique d'ADN bicaténaire métagénomique ou d'amplicons	6
<u>3)</u> Analyse de paramètres microbiens grâce aux outils de biologie moléculaire	7
a. Mesure de la Biomasse Moléculaire Microbienne	7
b. Analyse de la densité microbienne bactérienne et fongique par qPCR ..	7
c. Etude de la structure et de la composition taxonomique des communautés bactériennes et fongiques par métabarcoding	9
III/ Résultats et discussion	14
<u>1)</u> Dosage fluorométrique des ADN	14
<u>2)</u> Quantification de la Biomasse Moléculaire Microbienne.....	15
<u>3)</u> Mesure de l'équilibre taxonomique fongique/bactérien par qPCR	17
<u>4)</u> Discussion	19
Conclusion et perspectives	21
Références bibliographiques	
Annexes	
Annexe 1 : Composition du tube d'extraction contenant les billes ainsi que du tampon d'extraction pour un échantillon (5mL).....	
Annexe 2 : Point sécurité :.....	
Annexe 3 : Niveaux d'habilitations de la plateforme pour la salle BET :	
Annexe 4 : Composition du mix pour la qPCR :.....	

I/ Introduction

1) Présentation du lieu d'apprentissage

L'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement (INRAE) a été créé en janvier 2020 avec la fusion de l'Institut National de Recherche en Agronomie (INRA) et de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA) et représente la première institution de recherche au monde dans le domaine de l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. Le but de l'institut est de mener des recherches et d'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. Le centre INRAE Bourgogne-Franche-Comté travaille sur l'agroécologie (biodiversité, interactions biotiques et systèmes de culture innovants), le goût et l'alimentation, ainsi que sur les problématiques des territoires ruraux et périurbains qui sont des enjeux pour le futur et aujourd'hui. 7 unités composent le centre dont l'Unité Mixte de Recherche (UMR) Agroécologie dont l'objectif de recherche est le développement d'une agriculture durable pour produire qualitativement et quantitativement en phase avec les besoins alimentaires tout en respectant l'environnement. L'UMR est constituée en différents pôles et plateformes de recherche dont la plateforme GenoSol spécialisée dans la conservation et l'analyse des communautés microbiennes de sols environnementaux et anthropisés. Créée en 2008, GenoSol s'articule autour de trois services (Fig. 1) :



Figure 1 : Triptyque de l'organisation de la plateforme GenoSol.

- Le Conservatoire de Ressources Génétiques (CRG) qui peut aider aux prélèvements. Les sols sont tamisés à 4 mm puis lyophilisés. Près de 20 000 sols sont conservés à ce jour afin de préserver les ressources génétiques et de les mettre à disposition des scientifiques. C'est un outil unique permettant de conserver des grands échantillonnages spatio-temporels tout en les stockant de façon intacte pour les futures analyses.
- Le Laboratoire d'Analyses et de Développement Moléculaires (LADM) dont les deux objectifs sont les suivants :
 - Extraire et caractériser la diversité microbienne des sols par des outils moléculaires. Les méthodes sont standardisées depuis plus de 10 ans ce qui a permis la constitution d'un référentiel de données utilisé par l'équipe BIOCUM de l'UMR.
 - Réaliser la veille technologique et le développement de nouvelles méthodes pour améliorer et innover l'étude de cette diversité microbienne du sol.
- Le Système d'Information Environnemental (SIE) s'occupe de la gestion des données et de la gestion documentaire. Il est centré sur la base de données MicroSol qui va être remplacée par le Laboratory Information Management System (LIMS) en cours de déploiement. Ces outils permettent de suivre la vie des échantillons, répertorier les analyses effectuées et les données de caractérisation génétique des sols.

Depuis septembre 2015, le conservatoire puis la plateforme GenoSol (2018) sont certifiés ISO 9001:2015 par l'organisme « Lloyd's Register Quality Assurance » (LRQA) pour la conservation et l'analyse de la diversité microbienne des ressources génétiques. La plateforme suit donc un système de management de la Qualité qui permet de répondre aux attentes des clients de la plateforme.

C'est ainsi que depuis 2008, GenoSol, dans le cadre de projet scientifique a aidé à établir des bioindicateurs de qualité à partir du savoir-faire de l'UMR Agroécologie et permettant d'établir un référentiel de la qualité du sol.

2) Le sol, réservoir de la biodiversité et support de l'agriculture

Le sol, matrice essentielle à la vie, est un environnement complexe qui intervient dans plusieurs services écosystémiques (Fig. 2). Il est notamment relié au service d'approvisionnement en apportant des éléments nutritifs essentiels à la production agricole et aux végétaux [1]. Il participe également au service de la régulation via les flux de matière (stockage du carbone et de l'azote, échanges permettant la régulation des cycles chimiques), de filtration et de réservoir-tampon de l'eau de pluie luttant contre les inondations. Il a un rôle aussi dans le service de soutien et de régulation de l'air puisque les végétaux participent à la création de dioxygène via la photosynthèse. Il sert aussi au service d'approvisionnement puisqu'il s'agit d'une source principale de matières premières pour les industries. Enfin, il assure un rôle important aux services culturel (vestiges archéologiques), d'approvisionnement, de soutien et de régulation via la production de biomasse, mais aussi la biodiversité (faune, flore et communautés microbiennes) avec des milliards d'espèces par gramme de sol [2].



Figure 2 : Services écosystémiques.

La diversité biologique d'un sol est considérée comme importante pour la fertilité du sol et donc le rendement agricole via sa capacité à réguler les cycles chimiques. La vie du sol est composée de plusieurs classes d'organismes [3]. Tout d'abord, la macrofaune (taille supérieure à 2 mm) composée d'insectes, arachnides, myriapodes, mollusques et lombricidés. Ensuite, la mésofaune (taille comprise entre 0,1 et 2 mm) constituée des acariens, collemboles, protoures, diploures, symphiles et enchytréides. Puis s'ajoute la microfaune (taille inférieure à 0,2 mm) où sont retrouvés les nématodes, protozoaires, rotifères. Enfin, la microflore, composée par les microorganismes du sol de taille inférieure à 0,1 mm et comprends les bactéries, archéobactéries et les micromycètes (couramment surnommés champignons).

La structure et la composition des populations de microorganismes peuvent être utilisées comme bioindicateurs de la qualité des sols. Dans le cas présent, il était question d'évaluer l'impact des produits de dégradation de plastiques biodégradables sur la vie du sol dans le cadre du projet BIOMALEG (Biodégradabilité dans les sols des matériaux de

la filière légumière : fin de vie des résidus de polymères biodégradables). La plateforme GenoSol a été sollicitée pour effectuer des analyses descriptives et fonctionnelles de la communauté microbienne dans les sols en présence ou non de ces plastiques.

3) Contexte scientifique du projet BIOMALEG et objectif du projet d'apprentissage

A l'heure actuelle, de nombreux films de paillage plastiques (Tab. 1) sont employés dans l'agriculture pour permettre non seulement de protéger les plants de culture en préservant l'humidité dans le sol lors des périodes de forte chaleur, mais aussi d'empêcher le développement des adventices (herbes indésirables), concurrentes aux cultures, en évitant d'utiliser d'herbicides qui peuvent avoir un impact sur le sol et la vie biologique qu'il héberge. Néanmoins, les scientifiques s'interrogent notamment sur l'utilisation de ces films de paillage plastiques qui pourraient participer à la pollution microplastique dans les sols voire dans le cycle de l'eau. En effet, le plastique contenu dans ses films va être enfoui dans les sols, dégradé chimiquement et/ou biologiquement. Il pourrait être aussi transporté dans des courants d'eau et pourrait causer ainsi une pollution. De plus, les films plastiques utilisés ne peuvent pas être recyclés (problème lié à la présence de terre) ce qui pose la question de l'utilisation des films de polyéthylène (PE) avec la réduction des matières fossiles. Les chercheurs ont voulu travailler sur l'effet de ces films plastiques sur la vie microbienne du sol et déterminer leur impact sur les microorganismes du sol. Mon projet s'inscrit dans le projet scientifique nommé BIOMALEG commun à la chambre d'Agriculture de Bretagne, la plateforme GenoSol et l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme et qui a pour but de comparer l'effet de différents films de paillages biodégradables ou non sur le sol et ses organismes. En effet, des entreprises ont développé de nouveaux films de paillages dits « biodégradables » qui conservent les avantages des films de paillages mis qui sont capables d'être dégradés via les micros et macroorganismes telluriques. Ces films sont des matériaux composites mêlant plastique et matériaux biosourcés, qui seront appelés « biofilms ».

La plateforme GenoSol est en charge des mesures microbiennes sur les sols de l'essai BIOMALEG avec des outils de biologie moléculaire. Lors de mon apprentissage, j'ai effectué les analyses afin de connaître la variation des communautés microbiennes du sol par rapport aux différents apports de films de paillages.

Dans le cadre de ce projet, deux communautés microbiennes du sol sont étudiées, les bactéries et les champignons grâce aux technologies de biologie moléculaire et de métabarcoding. Les objectifs seront de mesurer la quantité, la diversité et l'équilibre de ces communautés microbiennes par des outils moléculaires comme l'extraction d'ADN, l'électrophorèse, la Réaction de Polymérisation en Chaîne en temps réel (qPCR) et le Séquençage Nouvelle Génération (NGS). Enfin, des outils mathématiques et statistiques seront employés pour analyser les résultats de ces indicateurs et comparer l'impact des types de films sur la qualité microbiologiques des sols.

Tableau 1 : Composition et caractéristiques des films de paillage.

Code film	Composants	Type de dégradation	Épaisseur (microns)	Densité	Largeur
A	Polyéthylène (PE) additivé	Chimio-fragmentable	10	0,95	1m40
B	PBAT (polybutylène adipate téréphtalate)	Biodégradable	17	-	
C	PBAT + amidon	Biodégradable	15	-	
D	PBAT + PLA	Biodégradable	14	-	
E	PVC-adjuvants	Chimiophoto-fragmentable	12	1,25	
F	PBAT + amidon	Biodégradable	17	1,33	
G	Polyéthylène (PE)	Non dégradable, plastique	25	-	
H	Sol nu, sans film de paillage	-	-	-	

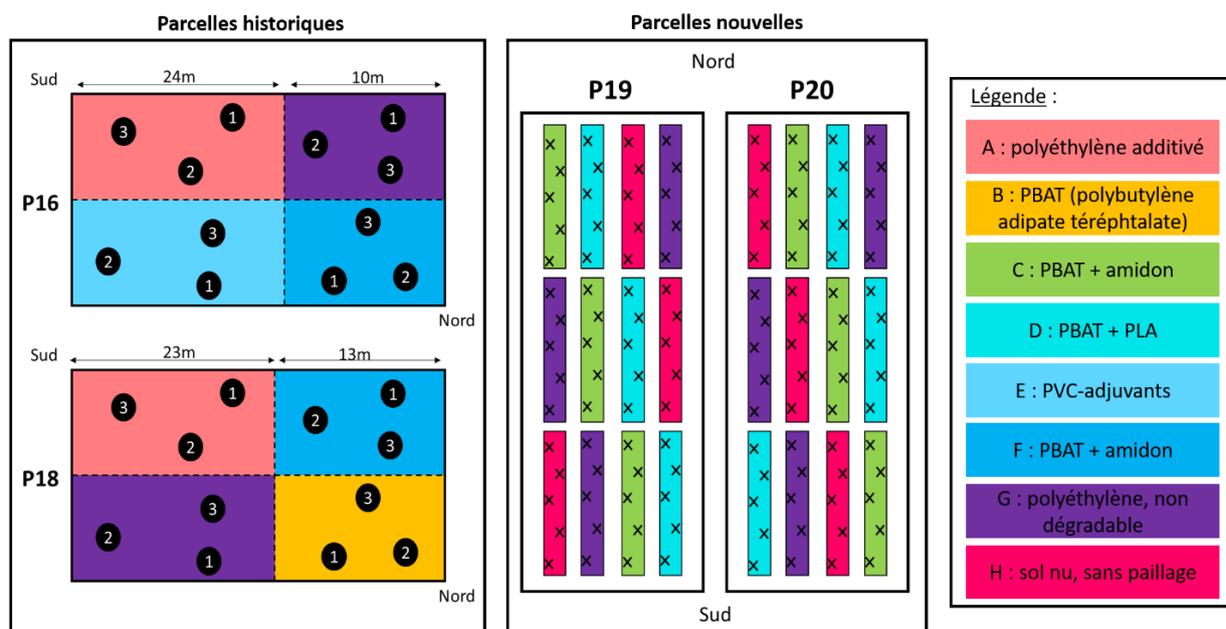


Figure 3 : Plan expérimental du dispositif terrain des parcelles historiques (P16 & P18) et nouvelles (P19 & P20).

II/ Matériel et méthode

1) Mise en place du dispositif expérimental et prélèvements sur le terrain

Le dispositif terrain est établi sur des parcelles de la station expérimentale d'Auray (Morbihan). Plusieurs parcelles sont mobilisées pour le projet BIOMALEG 2021-2023 avec des prélèvements annuels pour effectuer un suivi temporel. Deux grandes catégories de parcelles sont utilisées, deux parcelles dites historiques ayant reçues des apports de films de paillages de 2001 jusqu'à 2015, ainsi que deux autres parcelles dites nouvelles n'ayant reçues aucun paillage avant 2021. Les films ont des compositions et caractéristiques différentes et le nom commercial sera anonymisé (Tab. 1).

Les parcelles historiques sont les P16 et P18, elles sont divisées chacune en quatre zones (quatre modalités de films). Des prélèvements à la tarière sur une profondeur 0-20 cm sont effectués en triplicats sur chaque zone afin d'obtenir douze échantillons par parcelle (Fig. 3).

Les parcelles P19 et P20 sont les parcelles nouvelles, ayant reçu le premier apport de paillage au printemps 2021 pour la P19 et au printemps 2022 pour la P20. Ici, chaque parcelle est divisée en douze zones. Les quatre modalités de films sont déposées en trois répétitions par parcelle (Fig. 3). Cette fois, cinq prélèvements à la tarière (0-20cm) sont réalisés par zones pour être mélangés formant ainsi un échantillon composite afin d'obtenir à nouveau douze échantillons par parcelle. La parcelle P20 est un réplica temporel de la parcelle P19.

Les parcelles identifiées ont toutes été disposées de manière à éviter les biais en étant séparées géographiquement par des zones dites « tampon ». Afin de réaliser une étude en contexte de maraîchage prévu dans le projet, des potimarrons ont été implantés en juin 2021 sur la P19 et en mai 2022 pour la P20, à raison de 27 plants par zone.

Chaque échantillon de sol a été préparé selon les protocoles habituels du CRG. Il est donc scindé en deux, d'un côté, le sol brut, non tamisé qui est mis à sécher à l'air libre pour les analyses de physico-chimie, de l'autre côté, le sol destiné aux analyses microbiennes, celui-ci est tamisé à 4 mm puis quarté afin d'obtenir un échantillon homogène qui est lyophilisé et stocké à -40°C pour les futures analyses.

Au début du projet, les prélèvements d'échantillons de sols devaient se faire uniquement à la tarière sur la profondeur 0-20 cm. Toutefois, lors des discussions entre les partenaires, il a été choisi de réaliser d'autres échantillons à partir de sol adhérent au film afin de voir si les microorganismes réagissent différemment au contact du film. En effet, sur chacune des neuf zones de la P19, un morceau de film d'environ 30 x 30 cm a été récupéré en septembre 2021. Pour les autres trois zones correspondant au sol nu (sans film), des prélèvements de sol 0-20 cm sont faits à la tarière et servent de contrôle négatif (sans paillage). Dans le cadre de mon apprentissage, les échantillons analysés sont ceux de la campagne de prélèvements 2021, c'est-à-dire les prélèvements réalisés sur les parcelles historiques en mai et ceux de la parcelle nouvelle P19 en mai (avant la pose des films, servant de contrôles négatifs), en septembre (morceau de film pour récupérer les sols adhérents), puis en octobre (1 mois après enfouissement des films), soit au total 60 échantillons.

2) Obtention de la matrice d'ADN métagénomique issue d'échantillons de sols

Dans le cadre de ce projet, afin de réaliser cette extraction d'ADN métagénomique, un protocole ISO 11063 standardisé et révisé [4] a été appliqué aux 60 échantillons de sol et de sol adhérent venant des parcelles P16, P18 et P19.

a. Extraction de l'ADN des sols

L'extraction d'ADN métagénomique est réalisée à partir d'un gramme d'échantillon de sol et permet de récupérer tous les ADN métagénomiques présents dans l'échantillon de sol. Elle se réalise en trois étapes illustrées ci-dessous (Fig. 4).

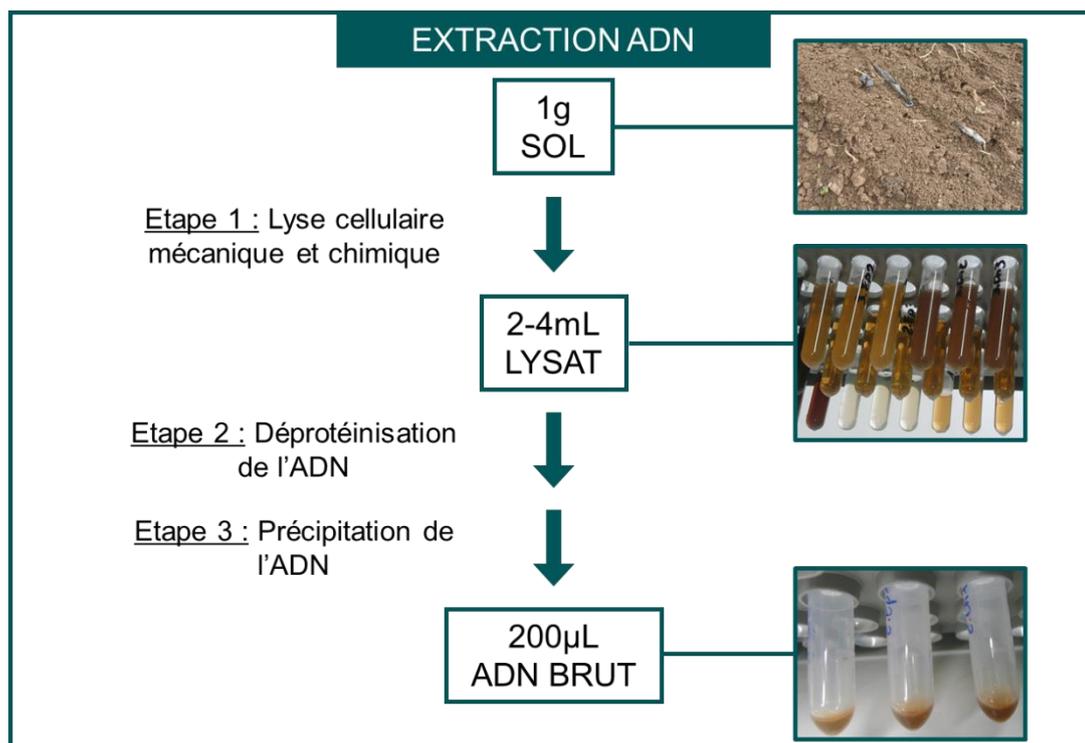


Figure 4 : Principe du protocole d'extraction d'ADN à partir d'un gramme de sol.

La première étape l'extraction consiste à réaliser un broyage mécanique (90 secondes à 4 m/sec) du sol à l'aide de billes (Annexe 1, Tab. 2) dans un broyeur de type Fast-Prep® (MP Biomedicals) couplé à une lyse chimique à chaud (70°C) des membranes cellulaires en présence d'un tampon de lyse (Annexe 1, Tab. 3) contenant du Tris 100 mM (pH 8), de l'EDTA 100 mM (pH 8), du NaCl 100 mM, du SDS 2 % et de l'eau ultra pure (UP). Ainsi, cette étape a pour but de casser les agrégats de sols, percer les membranes nucléaires et cytoplasmiques libérant ainsi le contenu des cellules donnant accès à l'information génétique. Une centrifugation permet de culotter les débris cellulaires avec le reste du sol et les billes pour récupérer le surnageant, nommé « lysat », contenant l'ADN et les protéines. A froid, 1 mL de lysat est mis en présence d'acétate de potassium 3 M (pH 5,5) afin de précipiter les protéines ainsi piégées dans les cristaux et éliminées par centrifugation. L'ADN débarrassé des protéines est récupéré dans le surnageant pour être mis en contact d'isopropanol absolu, incubé 1 h à -20°C pour faire précipiter l'ADN. L'ADN est culoté par centrifugation afin de subir un lavage à l'éthanol absolu avant de faire sécher ce culot d'ADN qui sera mis en suspension dans 200 µL d'eau UP. Cet ADN appelé « brut », contenant encore des polluants indésirables accrochés à l'ADN et surtout des acides humiques, polymères de carbone à fort poids moléculaire, responsable de la coloration, servira à l'estimation de la Biomasse Moléculaire Microbienne.

b. Purification des ADN bruts

L'objectif ici est de purifier les ADN bruts obtenus suite à l'extraction d'ADN de sol. Ainsi, les ADN seront limpides, exempts de tout contaminant ou inhibiteur, de qualité et en quantité suffisante pour les analyses moléculaires futures. La purification est réalisée sur 100 µL d'ADN brut à l'aide du kit *NucleoSpin Soil*[®] (Macherey-Nagel) dont le protocole est schématisé ci-dessous (Fig. 5).

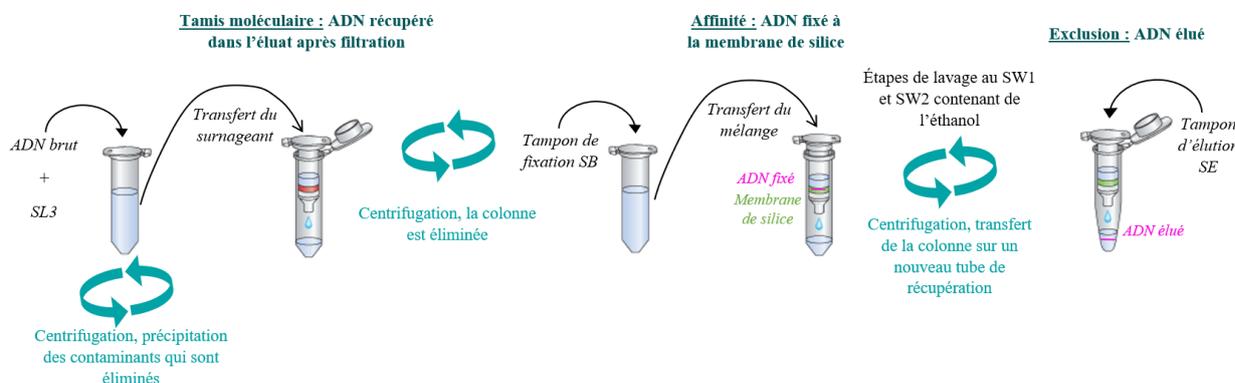


Figure 5 : Schéma du protocole de purification des ADN bruts à l'aide du kit *NucleoSpin Soil*.

La première colonne dans laquelle l'ADN brut est passé consiste en un tamis moléculaire permettant d'éliminer les plus grosses impuretés (acides humiques et molécules phénoliques) co-extraites. Le filtrat de la première colonne est récupéré et mis en présence d'un tampon avant d'être passé sur la deuxième colonne. Cette deuxième colonne, contenant une membrane de silice, est basée sur le principe d'affinité-exclusion, ainsi le tampon apporte le pH nécessaire à la fixation de l'ADN à cette membrane tandis que les co-extraits indésirables seront éliminés dans l'éluat par centrifugation. Après trois lavages successifs avec les solutions SW1 et SW2 du kit contenant notamment du thiocyanate de guanidine et de l'éthanol absolu, l'ADN est élué par ajout de 60 µL de tampon d'éluat du kit. L'ADN obtenu est limpide et est dit « purifié » puisqu'il ne contient plus de co-extraits. Cet ADN purifié est dosé par fluorométrie afin d'être normalisé puisqu'il servira de matrice pour les analyses de densité et de diversité microbienne.

c. Dosage fluorométrique d'ADN bicaténaire métagénomique ou d'amplicons

Cette méthode permet d'évaluer la quantité d'ADN double brin obtenue après extraction/purification ou la quantité d'amplicon formée après une Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en vue d'une normalisation des quantités d'ADN utilisées en analyses. Le dosage d'ADN bicaténaire est basé sur une relation de proportionnalité entre la quantité de doubles brins d'ADN et la fluorescence émise. Il est réalisé à l'aide du kit *QuantiFluor*[®] dsDNA System (Promega) utilisant le *QuantiFluor*[®] (Annexe 2, Tab. 4) comme fluorochrome. Cette molécule intercalante de l'ADN se lie spécifiquement dans la double hélice de l'ADN entre deux paires de bases voisines et fluoresce à 538 nm après avoir été excitée à une longueur d'onde de 435 nm. Le lecteur de plaque Infinite Pro 200 (TECAN) mesure cette fluorescence à 538 nm permettant ainsi de déterminer la concentration dans chaque échantillon grâce à la présence d'une gamme étalon d'ADN de phage lambda (fournie dans le kit) de concentrations connues (6 points de gamme compris entre 2 et 0,016 ng/µL). Cette analyse est réalisée en présence de témoins ADN de thymus de veau (BIORAD) de concentration connue (20 ng/µL) et d'un blanc (tampon TE 1X) évaluant le bruit de fond. La mesure a lieu en milieu tamponné (TE 1X) avec 5 µL d'ADN métagénomique purifié ou bien 2 µL de produit PCR en présence de fluorochrome dilué au $5/1000$ dans du TE 1X.

Les données sont automatiquement validées et collectées par un logiciel nommé Magellan, associé au lecteur de plaque, si i) coefficient $r^2 > 0,990$ pour la gamme ii) concentration moyenne de l'étalon entre 15 et 25 ng/ μ L iii) échantillons compris dans la gamme. Ainsi, pour chaque échantillon, la concentration en ADN bicaténaire est obtenue grâce à l'équation de la droite obtenue par la gamme étalon.

3) Analyse de paramètres microbiens grâce aux outils de biologie moléculaire

a. Mesure de la Biomasse Moléculaire Microbienne

La Biomasse Moléculaire Microbienne est un bioindicateur [5] permettant d'estimer l'abondance microbienne en mesurant la quantité totale d'ADN (bactérien, fongique, animal, végétal) dans 1 g de sol ayant passé le tamis de 4 mm. Elle permet de connaître l'état biologique du sol et renseigne sur le potentiel métabolique et les potentialités fonctionnelles des sols au niveau de la fertilité et de l'épuration.

Cette mesure est faite sur les ADN bruts (cf. II/ 2) a.) évitant les pertes aléatoires de la purification qui ne permettraient pas d'effectuer des analyses statistiques et une bonne reproductibilité. La migration électrophorétique se fait en gel d'agarose 1 % dans un bain conducteur (Tris Borate EDTA 1X) durant 2 h et exploite la polarité négative de l'ADN pour séparer les fragments d'ADN suivant leur taille. Les dépôts d'échantillons (10 μ L d'ADN bruts + 5 μ L de bleu de dépôt) sont complétés par un marqueur de taille (*Ladder 1kb*[®], Life Technologies) ainsi qu'une gamme étalon d'ADN de thymus de veau (BIORAD) de concentrations connues (5 points de gamme compris entre 25 et 2,5 ng/ μ L). Ici, la mesure de fluorescence se fait par utilisation de Bromure d'éthidium, BET (Annexe 2, Tab. 4) qui possède les mêmes propriétés que le *QuantiFluor*[®] (intercalant de l'ADN, proportionnalité entre la fluorescence et la quantité d'ADN) mais excité sous ultraviolets (UV). Le BET étant classé comme Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique (CMR), la plateforme impose des niveaux d'habilitations quant à la préparation et l'utilisation de ce dernier (Annexe 3, Tab. 5). La révélation du gel est faite dans un imageur (UVIDOC) relié à une caméra pour prendre une photo du gel. Cette image est analysée via le logiciel ImageQuant TL[™] en mesurant l'intensité de fluorescence pour chaque puits communiquant ensuite les données brutes si les critères de validation sont respectés (i. coefficient $r^2 > 0,990$ pour la gamme ii. échantillons compris dans l'intervalle de la gamme iii. le marqueur de taille est utilisé pour calibrer une aire de mesure de fluorescence précise et identique à chaque échantillon). La valeur de la biomasse moléculaire microbienne est donnée en ng d'ADN par g de sol extrait. Cette mesure est utilisée en routine dans la plateforme avec une bonne reproductibilité grâce au protocole standardisé alimentant le référentiel de données.

b. Analyse de la densité microbienne bactérienne et fongique par qPCR

La Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) est une analyse basée sur la PCR permettant de quantifier en temps réel le produit amplifié grâce à une lecture de la fluorescence émise. La plateforme réalise des analyses de qPCR afin de quantifier principalement deux gènes codant pour les ARN ribosomiaux d'intérêts : le 16S spécifique aux populations bactériennes et le 18S caractérisant les champignons. En faisant le ratio du nombre de copies des gènes (codants) $\frac{ARNr-18s}{ARNr-16s} \times 100$, il est possible de déterminer l'équilibre microbien dans un sol. Ici, la qPCR est réalisée en quantification absolue, c'est-à-dire avec une gamme d'ADN plasmidique linéarisée contenant le gène d'intérêt

(Eurogentec) allant de $0,5 \times 10^8$ à $0,5 \times 10^3$ copies/ μL en présence d'un fluorochrome, le SybrGreen® (Annexe 2, Tab. 4). Le SybrGreen® est également un intercalant de l'ADN permettant de déterminer la quantité d'amplicons formés à la fin de chaque cycle par une

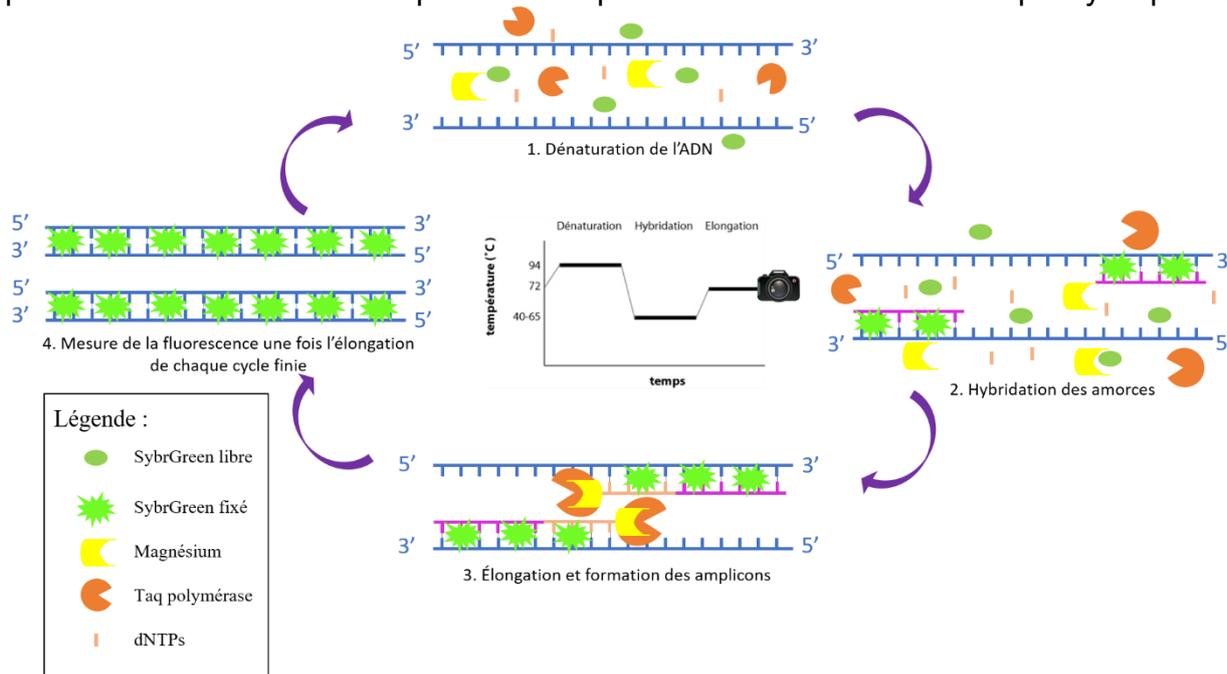


Figure 6 : Principe de la qPCR avec utilisation du fluorochrome SybrGreen.

relation de proportionnalité avec la fluorescence mesurée à 520 nm (Fig.6). Lorsque que l'efficacité de PCR atteint 100 %, 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.

Pour réaliser cette qPCR les échantillons d'ADN sont normalisés à 1 ng/ μL à partir des concentrations d'ADN propres. Ensuite, une gamme d'ADN étalon est préparée à six concentrations allant de $0,5 \times 10^8$ copies/ μL à $0,5 \times 10^3$ copies/ μL en 16S contre $0,5 \times 10^7$ copies/ μL à $0,5 \times 10^2$ copies/ μL en 18S. Enfin, la plateforme dispose d'un étalon de référence d'ADN de sol calibré à 1 ng/ μL servant à la validation de l'analyse dont le résultat attendu est connu. Le mix qPCR (Annexe 4, Tab. 6) peut ainsi être préparé à partir de Master Mix SybrGreen Takyon® à 1X final (Eurogentec, contenant les dNTPs, le SybrGreen, la Taq polymérase, le tampon et les ions magnésium), de T4gp32 apligene à 0,5 μg final (MP Biomedicals), des amorces sens et antisens spécifiques au gène ciblé à 1 μM final chacune ainsi que de l'eau UP. Il est déposé en plaque 96 puits à raison de 13 μL par puits (gamme, échantillon, étalon et témoin négatif) auxquels sont ajoutés les 2 μL d'ADN (échantillons, gamme, contrôle G4) ou 2 μL d'eau UP pour les témoins négatifs (NTC). La plaque est scellée avec un film optique puis placée dans l'appareil StepOne Plus© (Applied Biosystem) dans lequel a lieu le run thermique (Fig. 7) pour une durée d'environ 2 h.

Programme thermique : qPCR 16s			Programme thermique : qPCR 18s			
	temps	t° (°C)		temps	t° (°C)	
Dénaturation	15 min	95	x 35 cycles	Dénaturation	10 min	95
Dénaturation	15 sec	95		Dénaturation	15 sec	95
Hybridation	30 sec	60		Hybridation	30 sec	50
Elongation	30 sec	72		Elongation	1 min	72
Melt Curve	95°C - 15 sec / 60°C - 15 sec / (0,5°C/sec) / 95°C - 15 sec			95°C - 15 sec / 60°C - 15 sec / (0,5°C/sec) / 95°C - 15 sec		x 35 cycles

Figure 7 : Programmes thermiques des qPCR des gènes codants les ARNr 16S et 18S.

L'appareil est relié au logiciel *StepOne Software* (Applied biosystems) pour suivre en temps réel l'évolution de la qPCR et récupérer les courbes d'amplifications, la droite étalon, la Melt Curve et les résultats bruts (Ct et nombre de copies) sous forme de fichier Excel. La courbe d'amplification est divisée en trois phases (Fig.8) avec dans un premier temps le bruit de fond où les gènes cibles sont en quantité insuffisante pour être distinctement identifiés et quantifiés. Ensuite, la phase exponentielle, ou linéaire, durant laquelle il y a une relation de proportionnalité entre la quantité de produits formés et la fluorescence mesurée. Au début de cette phase, l'appareil calcule le seuil threshold, qui est la limite de détection minimale éliminant le bruit de fond, il est fixé à 0,2 afin de calibrer toutes les qPCR sur le même seuil. 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 appelé le Cycle threshold (Ct). Enfin, la phase plateau correspond à la limite d'amplification due à une consommation totale des composants de la PCR (amorces, nucléotides...).

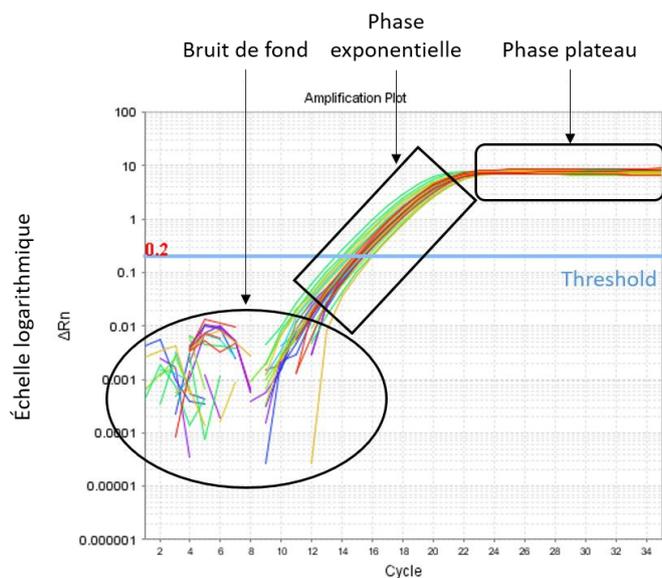


Figure 8 : Exemple de courbe d'amplification obtenue avec les différentes phases.

Les Ct obtenus pour les points de gamme permettent de tracer une droite étalon (Ct en fonction du nombre de copies du gène cible) puisqu'il s'agit d'une quantification absolue. Les Ct des échantillons sont alors reportés sur cette droite étalon pour déterminer le nombre de copies du gène dans chaque échantillon qui servira à calculer le ratio $\frac{\text{nombre de copies du gène ARNr-18s}}{\text{nombre de copies du gène ARNr-16s}} \times 100$ qui sert d'indicateur de l'équilibre microbien.

c. Etude de la structure et de la composition taxonomique des communautés bactériennes et fongiques par métabarcoding

L'étude de la diversité taxonomique s'effectue par l'amplification de gènes cibles et le séquençage nouvelle génération (NGS). Cette technique permet l'obtention d'un grand nombre de lectures. La plateforme GenoSol ne possède pas de séquenceur et a donc envoyé les bibliothèques à la plateforme de séquençage GeT-Plage. L'amplification et la préparation des bibliothèques ont été prises en charge par GenoSol au sein de mon projet d'apprentissage. La plateforme utilise cette technique afin de lire les séquences des amplicons du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S constituant la petite sous-unité du ribosome des procaryotes notamment les bactéries et du gène ITS2 (espaceur interne transcrit), fragment inter-gènes des petites et grandes sous-unités des eucaryotes dont les champignons. Ces deux gènes sont très utilisés en métabarcoding puisqu'ils possèdent un taux de mutations inter-genre élevé avec un fort polymorphisme ainsi qu'une forte présence de ces gènes dans l'ADN génomique permettant de distinguer facilement différents genres et phyla.

Dans le cadre du projet, le séquençage se fait sur un appareil MiSeq Illumina sur amplicons avec des méthodes transférées par le prestataire de séquençage GeT-Plage qui ont été déployées et adaptées pour les besoins de la plateforme Genosol. La technologie NGS fournit à l'heure actuelle des milliers de données pour un échantillon,

correspondant à une grande profondeur de séquençage. Toutefois, la plateforme GenoSol est limitée à des bases de données disponibles pour assigner les séquences lues à un organisme, elle ne nécessite pas une grande profondeur de séquençage. Cette technologie NGS permet de multiplexer les échantillons tout en fournissant un nombre suffisant de lectures par échantillon. Le multiplexage consiste à attribuer un index (ou MID contenant ici 6 nucléotides) spécifique à chaque échantillon afin de le reconnaître par bio-informatique pendant l'analyse des données. Ainsi, la plateforme réalise habituellement un mélange des échantillons à séquencer en quantité égale, appelé mélange équimolaire constituant la banque (ou librairie). Ce processus de multiplexage nécessite l'addition de courtes séquences nucléotidiques (Fig. 9) permettant la fixation de l'ADN cible à la flow cell (support utilisé pour un séquençage NGS Illumina), l'enrichissement PCR des fragments d'ADN liés par adaptateur uniquement ainsi que l'indexation (barcoding) des échantillons.



Légende :

- P5 et P7 : Sites d'attachement à la flow cell (deuxième demi-adaptateur)
- MID : index spécifique à chaque échantillon
- ½ adaptateur : sites de liaison d'amorces de séquençage correspondant au « TruSeq Universal Adapter » Illumina
- F et R : amorces sens (F) et antisens (R) spécifiques à la cible
- Fragment ADN cible : fragment d'ADN à séquencer

Figure 9 : Schéma de fixation des adaptateurs et index.

Elle se fait en deux grandes étapes, tout d'abord, il s'agit de l'étape d'amplification de la séquence cible par une PCR dite cible, ici sur la cible codant l'ARNr-16S (bactéries avec les oligonucléotides F497/R888) et d'autre part sur la cible ADNr-ITS2 (champignons avec les oligonucléotides ITS86F/ITS4R). Cette étape permet de sélectionner les communautés ciblées présentes dans le sol, tout en fixant un demi-adaptateur qui permettra le multiplexage. La deuxième étape se fait avec une PCR multiplexe qui est universelle et permet d'ajouter les index propres à chaque échantillon et les adaptateurs permettant le séquençage. Il aurait pu être envisageable de regrouper les deux PCR en une seule, toutefois, cela aurait nécessité des amorces très longues imposant une température d'hybridation trop élevée (supérieure à celle d'élongation) ce qui aurait été néfaste à l'amplification. Au sein de la plateforme GenoSol, la méthode de PCR cible pour l'ADNr-ITS2 est prête tandis que pour le gène codant l'ARNr-16S, il a fallu adapter le protocole existant pour ce gène. Les données de séquençage seront envoyées par le prestataire à l'état brut et seront analysées dans le service SIE de la plateforme GenoSol notamment via un pipeline d'analyse bio-informatique capable de reconnaître les séquences des index permettant le démultiplexage et l'étude taxonomique.

Pour adapter la PCR ciblant le gène codant pour l'ARNr-16S, l'enjeu principal était de vérifier les températures d'hybridation des amorces+demi-adaptateurs. A l'origine, les adaptateurs étaient ajoutés par ligation une fois le mélange équimolaire réalisé, mais ici ils sont ajoutés par les deux PCR. Les amorces étant donc plus grandes, les températures de fusion (T_m : température melting) de ces dernières sont donc différentes (dépendantes du nombre et du type de bases). Pour déterminer la température optimale à l'amplification du gène, une PCR cible en gradient de température d'hybridation a été réalisée. Seule la température d'hybridation a été modifiée par rapport au protocole existant. Ce test a été réalisé sur 10 échantillons de références (forêt, limon, prairies) et des contrôles (ADN de sol) connus en plus des témoins négatifs. Grâce à un thermocycleur à gradient, les températures d'hybridations ont été testées de 52°C à 62°C avec une incrémentation de 2°C par pallier (Fig. 10). En effet, les températures de fusion des amorces utilisées sont de 65°C et 68°C, mais ces températures s'avèrent trop proches de la température d'élongation (72°C), il a donc été choisi de conserver un écart de minimum 10°C de différence l'étape d'élongation (72°C) pour que la réaction se fasse au mieux.

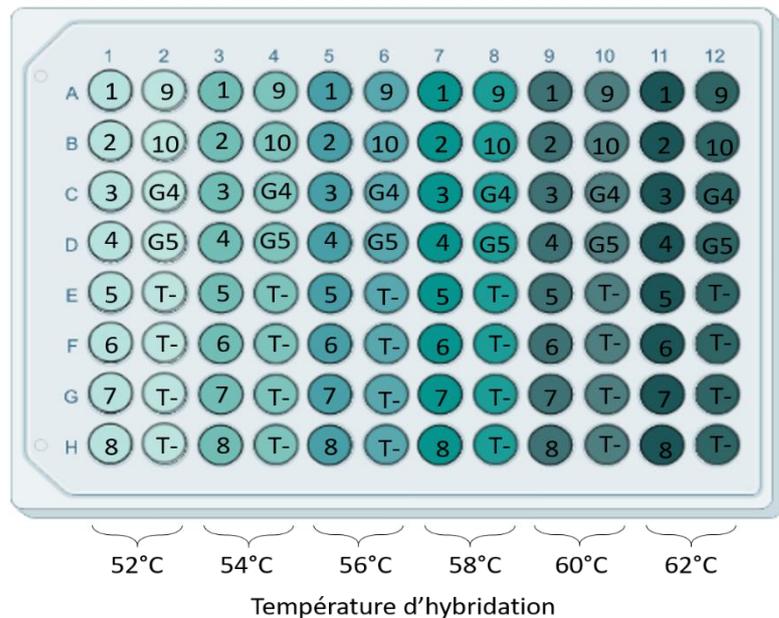
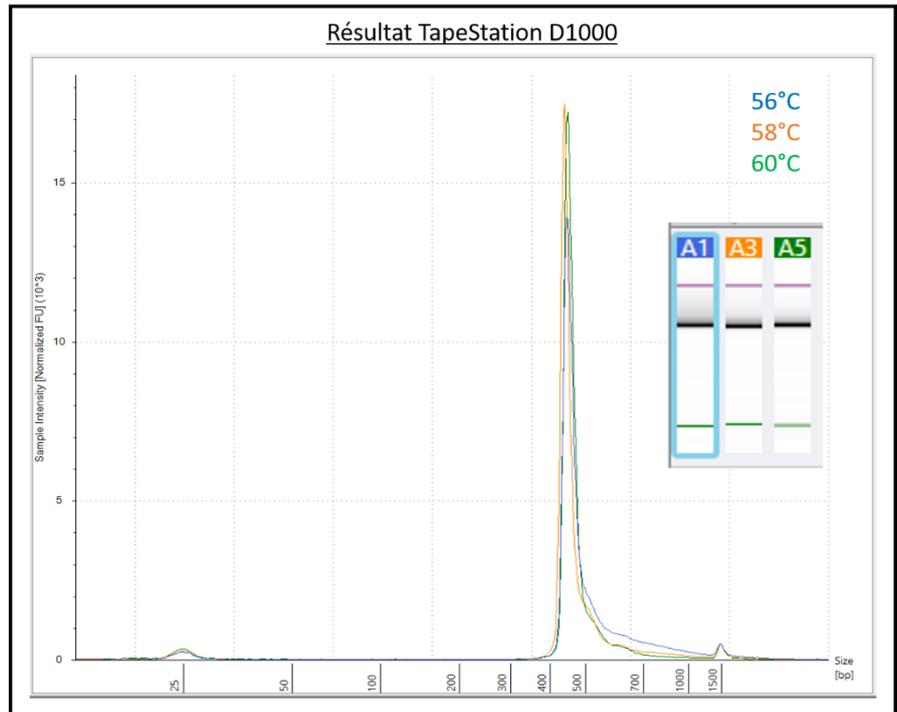
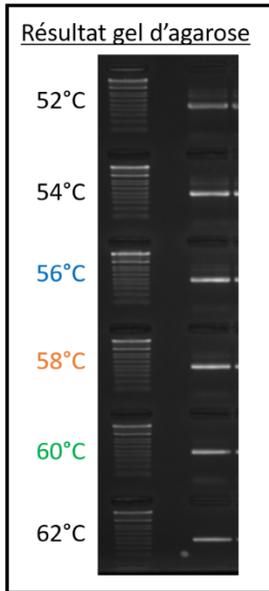


Figure 10 : Plan de la plaque de la PCR cible codant l'ARNr-16S gradient température d'hybridation.

5 μ L de produits PCR mélangés à 2 μ L de bleu de dépôt ont été déposés sur gel d'agarose 2 % TBE. Après visualisation du gel, tous les échantillons de 1 à 10 montrent une bande d'amplification à la taille attendue (environ 400 paires de bases). Toutefois, pour les températures 52°C à 56°C, plusieurs bandes sont présentes en plus de la bande attendue (sur les échantillons et les contrôles) ce qui signifie une amplification moins stringente avec des amorces fixées sur des régions qui ne sont pas 100 % complémentaires tandis que pour les températures 58°C, 60°C et 62°C, ces bandes supplémentaires sont très peu intenses voir absentes (62°C) traduisant une meilleure spécificité d'hybridation des amorces. En revanche, une diminution de l'intensité de la bande attendue est observée avec l'augmentation de la température d'hybridation notamment pour 62°C (Fig. 11). Le choix de la température d'hybridation doit prendre en compte le risque d'obtenir des bandes aspécifiques et la représentativité de la population.

Reference LADM_Colmar.1



Résultat dosage fluorométrique	Echantillon-T°C	Colm-56°C	Colm-58°C	Colm-60°C
Concentration en ng/μL		18,5	19,3	14,8

Figure 11 : Exemple de résultats obtenus sur gel d'agarose 2 %, TapeStation D1000 et dosage fluorométrique pour l'échantillon Référence LADM Colmar.1

Suite à une concertation avec les responsables, il a été choisi de purifier les produits PCR des températures 56-58-60°C, via le kit de purification par billes magnétiques ProNex® Size-Selective Purification System (Promega) permettant la purification d'échantillon d'ADN de taille comprise entre 100 et 750 paires de bases (pb) ce qui est le cas ici avec des amplicons d'environ 400 pb. Ces trois températures sont choisies car elles permettent d'avoir une quantité d'amplicons formés suffisante avec le moins d'amplification non-spécifique. La première étape consiste à ajouter 25 µL de billes magnétiques, en milieu tamponné, aux 20 µL de produits PCR. Les fragments d'ADN supérieurs à 100 pb vont se fixer sur les billes qui seront ensuite aimantées via un support pour les accrocher sur la paroi du tube. A la deuxième étape, les billes liées à l'ADN pourront être lavées avec du « wash buffer », fourni dans le kit, contenant notamment de l'éthanol absolu, durant 2 x 30 secondes éliminant les déchets de PCR avant d'être séchées au bain-marie à sec à 37°C. Enfin, la troisième étape consiste à éluer les ADN en ajoutant 25 µL de tampon d'élution fourni dans le kit.

A la suite de cette purification, les produits PCR (2 µL) sont quantifiés par dosage fluorométrique (cf. II/ 2) c.) en présence de *QuantiFluor*® dilué dans du TE 1X pour comparer les quantités d'amplicons obtenues. Enfin, les produits PCR purifiés (56, 58 et 60°C) ont été testés sur le kit D1000 TapeStation 4200® (Agilent Technologies) qui consiste en une micro-électrophorèse en capillaire permettant une validation *Quality Control* (QC) de la PCR gradient et la visualisation de la courbe d'intensité de la fluorescence (unité de fluorescence 10³) en fonction de la taille du fragment (en paire de bases) (Fig. 11).

Les résultats obtenus par TapeStation sont croisés avec les concentrations de dosage fluorométrique et les photos des gels d'agarose. Tous les résultats convergent dans le même sens, plus la température d'hybridation est faible et plus il y a une mauvaise hybridation des amorces tandis qu'une température haute élimine cette aspécificité mais diminue la quantité d'amplicons in fine. Suite à une réunion entre différents corps de la plateforme (bio-informaticien, assistante ingénieure et technicienne), il a été choisi de réaliser la PCR cible du gène codant l'ARNr-16S à la température d'hybridation de 58°C pour laquelle la quantité d'ADN obtenue est la plus forte et le risque d'hybridation non-spécifique est largement diminué.

Une fois la température d'hybridation choisie, les PCR cibles ont été lancées en parallèle sur les gènes codant les ARNr 16S et ITS2 sur les 60 échantillons du projet BIOMALEG auxquels sont ajoutés les contrôles internes d'ADN de sol ainsi qu'un contrôle externe, la MOCK (Microbial Community Standard - Ozyme) et deux témoins négatifs. Tous les ADN ont été préalablement normalisés à 1 ng/µL avant d'être ajoutés à raison de 5 ng par échantillon une fois le mix PCR (tampon, Taq polymérase, T4gp32, dNTPs, eau UP et des amorces sens et antisens spécifiques à la cible et reliées au demi-adaptateur) réparti dans tous les puits à raison de 20 µL pour le mix 16S et 45 µL pour le mix ITS2. Les plaques PCR 96 puits scellées peuvent ensuite être mises dans le thermocycleur où a lieu le run thermique spécifique au gène ciblé (Fig.12).

Programme thermique			16s	Programme thermique			ITS2
	temps	t°			temps	t° (°C)	
Dénaturation	2min	94°C	x 35 cycles	Dénaturation	2 min	95	x 35 cycles
Dénaturation	30sec	94°C		Dénaturation	30 sec	95	
Hybridation	30sec	58°C		Hybridation	30 sec	55	
Elongation	1min	72°C		Elongation	1 min	72	
Elong. finale	7min	72°C		Elong. finale	10 min	72	

Figure 12 : Programmes thermiques spécifiques utilisés pour les PCR cibles 16S et ITS2.

Une fois les runs terminés, les PCR sont vérifiées sur gel d'agarose 2 % pour s'assurer d'une part la bonne amplification de tous les échantillons/contrôles mais aussi pour vérifier les témoins négatifs permettant de valider ou non la plaque PCR. Dans le cas présent, les gels de vérification des plaques 16S et ITS2 ont permis de valider la non-amplification des témoins négatifs et la bonne amplification des 69 échantillons et contrôles de chacune des deux plaques. Les produits PCR peuvent donc être purifiés à l'aide du kit ProNex® Size-Selective Purification System (Promega). La méthode est rigoureusement identique à la purification effectuée après la PCR 16S gradient hormis le volume de billes ajouté pour la plaque ITS2 qui passe de 25 µL à 56,25 µL puisque le volume de produit PCR est ici de 45 µL au lieu de 20 µL.

Après purification, les produits de PCR cible (2 µL) sont quantifiés par dosage fluorométrique *QuantiFluor*® (cf. II/ 2) c.) avec toujours le même protocole. Les concentrations obtenues pour chaque échantillon permettent d'abord de vérifier qu'il n'y a pas eu de perte d'ADN lors de la purification, mais surtout de connaître les concentrations en ADN afin de normaliser tous les échantillons à 5 ng/µL en vue de la PCR multiplexe.

Les échantillons purifiés sont donc normalisés à 5 ng/µL afin de réaliser la PCR multiplexe identique aux deux gènes codant les ARNr-16S et ITS2. Cette fois, un mix PCR est réalisé à l'aide de Taq polymérase, de son tampon issu tout deux du kit MTP Taq® (Sigma), de dNTPs, d'eau et de l'amorce sens contenant la deuxième partie de l'adaptateur avec l'extrémité P5. Le mix est réparti à raison de 45,75 µL par puits où sont ajoutés 1,25 µL de l'amorce antisens contenant l'autre demi-adaptateur avec l'index et l'extrémité P7. Cette amorce est donc différente pour chaque échantillon (3 µL d'ADN de manière à apporter 15 ng par puits). Les plaques PCR 96 puits sont scellées et mises dans le thermocycleur pour lancer le run thermique de multiplexage (Fig.13).

Programme thermique			
	temps	t° (°C)	
Dénaturation	1 min	94	x 12 cycles
Dénaturation	1 min	94	
Hybridation	1 min	65	
Elongation	1 min	72	
Elong. finale	10 min	72	

Figure 13 : Programme thermique de la PCR multiplexe.

Une fois le programme terminé, les produits PCR sont vérifiés sur gel d'agarose 2 % comme pour la PCR cible. Dans le cas présent, les gels de vérification des plaques 16S et ITS2 multiplexées ont permis de valider la bonne amplification de tous les échantillons et contrôles de chacune des deux plaques. Les plaques PCR sont ainsi purifiées à l'aide du kit ProNex® Size-Selective Purification System (Promega) de la même manière que pour la PCR cible avec un volume de billes de 56,25 µL, puisque le volume de produit PCR est de 45 µL. Les produits PCR à présent purifiés sont dosés par fluorométrie, *QuantiFluor*® (cf. II/ 2 c.), avec toujours le même protocole. Les concentrations obtenues permettent de vérifier qu'il n'y a pas eu de perte d'ADN par purification, mais surtout de connaître les concentrations exactes en ADN en vue du mélange équimolaire.

Le mélange équimolaire est réalisé de façon à apporter tous les échantillons de PCR multiplexe obtenus pour le gène codant l'ARNr-16S et l'ADNr-ITS2 en quantité égale tout en respectant les prérequis du prestataire de séquençage à savoir une quantité minimale de 450 ng ainsi qu'un volume minimal de 35 µL. Les produits PCR étant assez concentrés, il est nécessaire de faire un mélange équimolaire avec une quantité finale d'ADN très importante pour travailler avec des volumes supérieurs à 1 µL et limiter les erreurs lors du pipetage. Il a donc été choisi de faire un mélange avec une quantité finale de 15 000 ng avec un total de 140 échantillons (contrôles compris), la quantité d'ADN à apporter par échantillon est donc $n = \frac{\text{quantité totale}}{\text{nombre échantillons}} = \frac{15\,000}{140} \approx 107 \text{ ng}$.

Une fois tous les échantillons ajoutés, le volume total du mélange est de 295,6 µL. Un aliquot de 100 µL est donc réalisé dans un tube à vis et est envoyé au prestataire de séquençage.

III/ Résultats et discussion

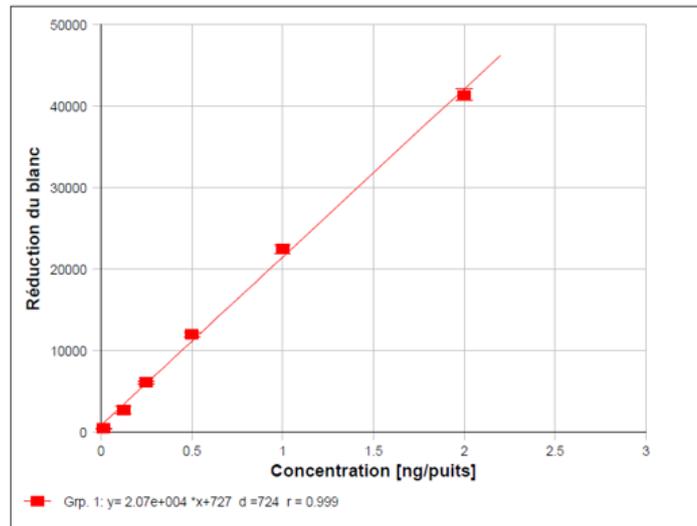
Pour chacune des analyses évoquées ci-après, il est nécessaire d'effectuer dans un premier temps une validation propre à l'analyse avec des critères fixés par la plateforme. Ensuite, à partir des résultats, une comparaison en fonction des séries de travail est effectuée pour s'assurer de l'absence de biais techniques et de l'impact des séries analytiques. Cette validation technique a été réalisée pour les différentes analyses mais ne sera pas expliquée dans le rapport. Une fois la validation technique faite, les résultats peuvent être exploités afin de comparer les différentes modalités terrain (type de prélèvements, type de films, parcelles, mois). L'analyse de la diversité n'est pas présentée dans les résultats puisque le prestataire de séquençage ne nous a pas encore retourné les données.

1) Dosage fluorométrique des ADN

Avant de pouvoir utiliser les données obtenues au dosage fluorométrique des ADN propres, il est nécessaire de vérifier que les critères de validation de l'analyse sont respectés. En effet, afin de répondre à une certaine qualité, la plateforme a fixé trois conditions à respecter pour que l'analyse soit conforme. Tout d'abord, le coefficient de détermination r^2 de la droite étalon se doit d'être supérieur à 0,990 pour s'assurer d'une bonne répétabilité des dépôts. De plus, la concentration moyenne de l'étalon de référence (calibré à 20 ng/μL) obtenue doit se situer entre 15 et 25 ng/μL.

Une fois ces critères validés, le logiciel Magellan, associé au lecteur de plaque, calcule et collecte les données brutes de concentration dans un fichier Excel (Fig.14) contenant les données de concentrations en ADN obtenues en ng/μL. Ces données ne sont pas exploitées et servent uniquement pour les normalisations avant PCR et qPCR.

Régression linéaire



Critères de validation QC

N. de groupe d'exp 1
 Critères de validation : Conc.moyenne. (ng/μl)
 $r^2 > 0.99$ --> TRUE
 $RF1 \leq 25$ and $RF1 \geq 15$ --> TRUE
 $SM1 \leq ST1_2$ --> TRUE
 Critères de validation : Conc. unique. (ng/μl)
 $RF1_1 \leq 25$ and $RF1_1 \geq 15$ --> TRUE
 $RF1_2 \leq 25$ and $RF1_2 \geq 15$ --> TRUE
 $RF1_3 \leq 25$ and $RF1_3 \geq 15$ --> TRUE

Figure 14 : Exemple de droite étalon obtenue par dosage fluorométrique (ici les 60 ADN propres)

2) Quantification de la Biomasse Moléculaire Microbienne

La Biomasse Moléculaire Microbienne a été mesurée de manière identique et répétable pour les 60 échantillons. Les images des gels d'agarose ont été analysées via le logiciel ImageQuant TL™ en utilisant le marqueur de taille pour calibrer l'aire de mesure de fluorescence identique entre chaque puits (Fig.15). Cette aire de mesure se fait entre 1000 et 12 000 paires de bases (via le marqueur de taille) afin d'avoir uniquement la fluorescence due à l'ADN génomique. En effet, des ARN ribosomaux ou des fragments d'ADN dégradés de taille inférieure à 1000 pb peuvent modifier la valeur de la fluorescence et donc fausser les résultats.

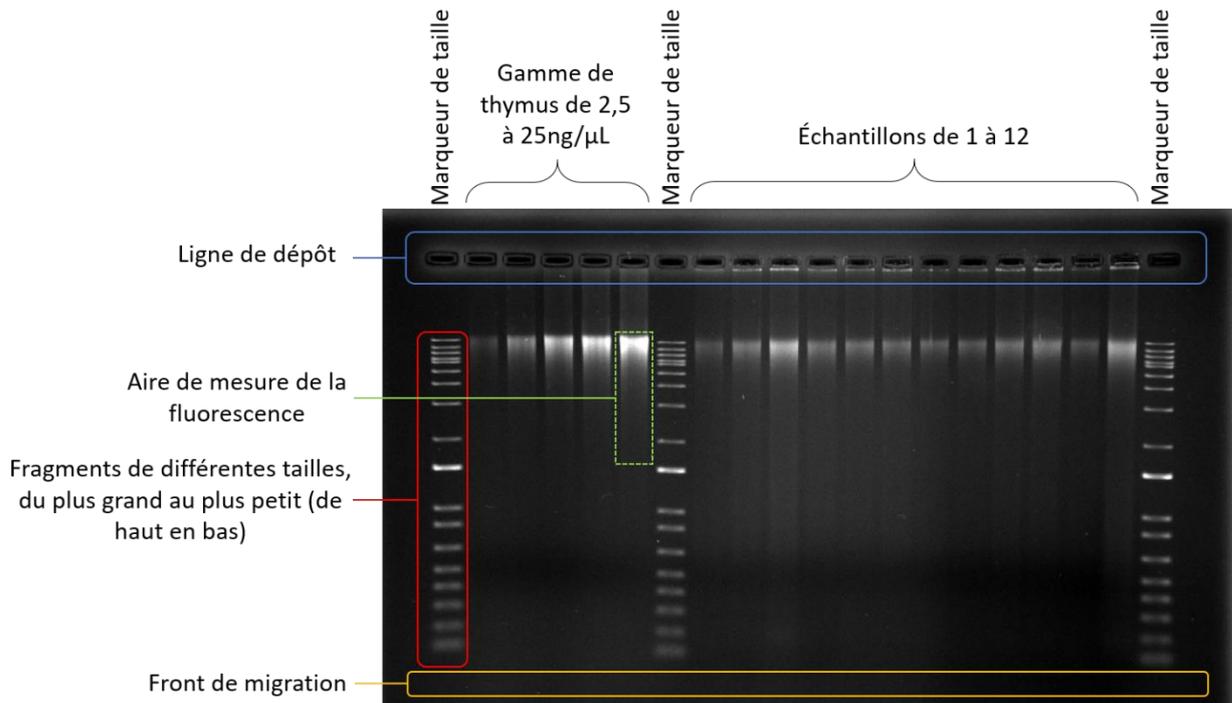


Figure 15 : Exemple de plan d'un gel d'agarose pour mesure de la Biomasse Moléculaire Microbienne.

Les données brutes de fluorescence sont récupérées en fichier Excel permettant de vérifier que les critères de validation sont respectés. Pour qu'une image soit valide, le coefficient de détermination r^2 de la gamme doit être supérieur à 0,990 et les échantillons doivent être compris dans la gamme auquel cas il sera nécessaire de les diluer plus ou moins. La biomasse, exprimée en μg d'ADN par g de sol extrait, permet de voir si les différentes modalités induisent un développement différent des communautés microbiennes dans les sols.

Avant de pouvoir exploiter les résultats, les données sont testées pour voir l'existence ou non d'un impact analytique, c'est la validation technique. Dans le cas présent, la mesure de cette BMM a été validée d'un point de vue analytique puisque les résultats ne semblent pas affectés par un biais technique, les résultats bruts peuvent donc être exploités par des tests mathématiques et statistiques pour rechercher un effet biologique suivant les modalités. Les analyses statistiques des données obtenues pour les biomasses microbiennes sont effectuées via RStudio®. Comme chaque modalité ne contient pas au minimum 30 réplicats, il n'est pas possible d'effectuer un test de normalité comme le test de Shapiro habituellement utilisé pour étudier la distribution des données afin de savoir si elles suivent une loi normale. Dans ce cas, les données seront exploitées par un test non-paramétrique, le test Kruskal-Wallis, qui est une ANOVA non-paramétrique, dont le résultat sera exporté sous forme de graphique en box plot (Fig.16). Un test post-hoc a été réalisé, afin d'obtenir les classes statistiques, ainsi qu'une correction de Bonferroni.

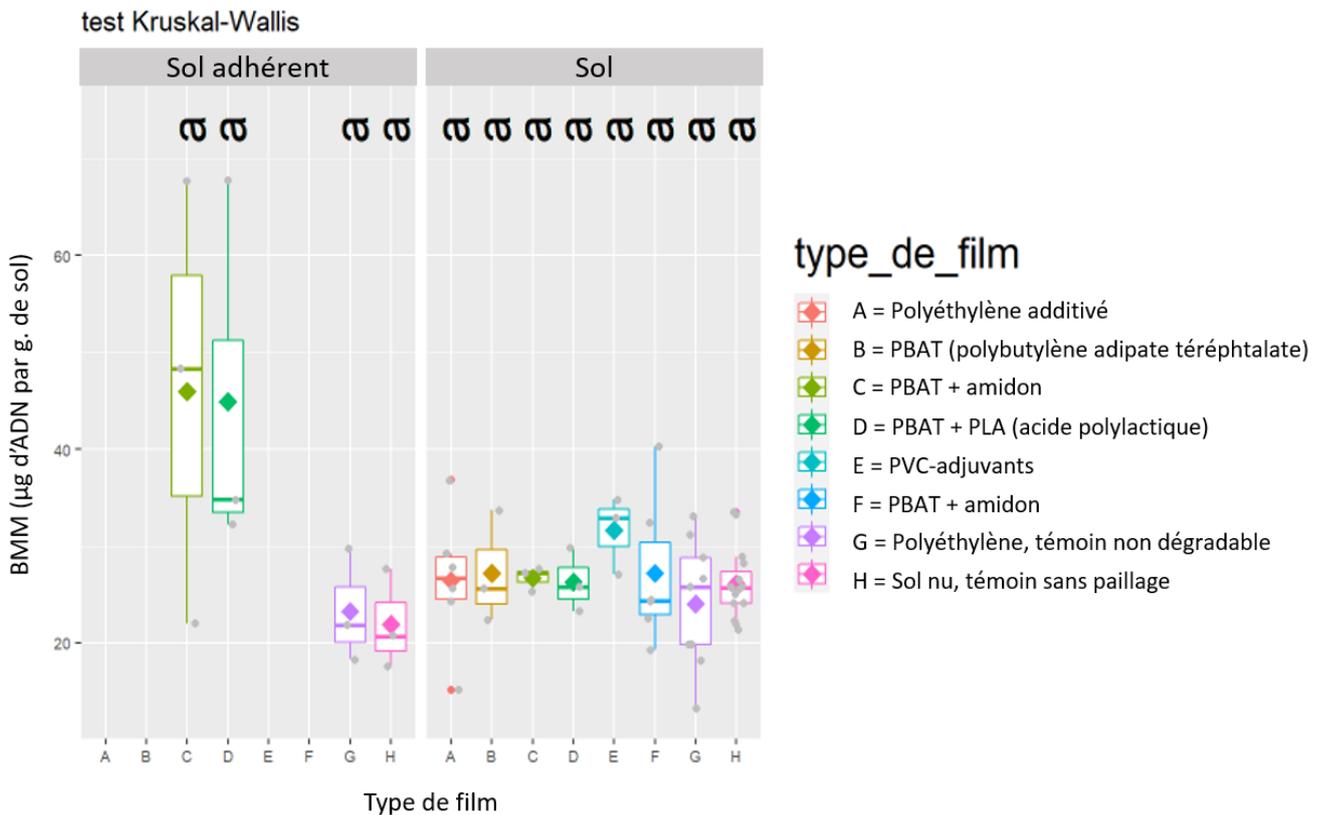


Figure 16 : Graphique du test non-paramétrique Kruskal-Wallis sur les données de biomasses suivant le type de paillage pour les prélèvements de sols et de sols adhérents.

Pour rappel, les prélèvements de sols adhérents ont été réalisés au bout de 4 mois après la pose des films de paillage. Le test de Kruskal-Wallis a permis de mettre en évidence qu'au bout de ces 4 mois, les différences observées entre les biomasses obtenues pour les échantillons de sols adhérents aux films biodégradables C et D ne sont pas significatives malgré l'observation d'une hausse de la biomasse moyenne pour ces deux modalités par rapport aux modalités sol nu et témoin non-dégradable (sols adhérent) ainsi que toutes les modalités sols. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour valider ou non cette hausse observée.

3) Mesure de l'équilibre taxonomique fongique/bactérien par qPCR

L'évaluation de la densité microbienne a été déterminée par deux PCR quantitatives, chacune ciblant un gène spécifique, le gène codant l'ARNr-16S pour les organismes procaryotes (bactéries) et le gène codant l'ARNr-18S pour les eucaryotes (champignons). Pour chaque analyse, le logiciel délivre les courbes d'amplifications, la droite étalon, la Melt Curve ainsi que les données brutes (Ct) exportées sous Excel.

Pour qu'une analyse soit valide, elle doit respecter les critères fixés par la plateforme à savoir un coefficient de détermination r^2 de la gamme doit être supérieur à 0,990 ; mais aussi que l'efficacité de PCR Eff% soit comprise entre 85 et 110 %, soit une pente comprise entre -3,1 et -3,74. De plus, les cycles threshold (Ct) des échantillons doivent être compris dans ceux de la gamme de standards (Fig.17). Enfin, il faut comparer la valeur du Ct du témoin interne G4 par rapport à celle attendue. Dans le cas présent, les analyses des 60 échantillons sont toutes valides, la validation technique a également été vérifiée, les données brutes peuvent donc être exploitées par des analyses statistiques sous RStudio®. Cette analyse de qPCR est effectuée de façon routinière à la plateforme et les ratios moyens obtenus sont généralement compris entre 1 et 7 %.

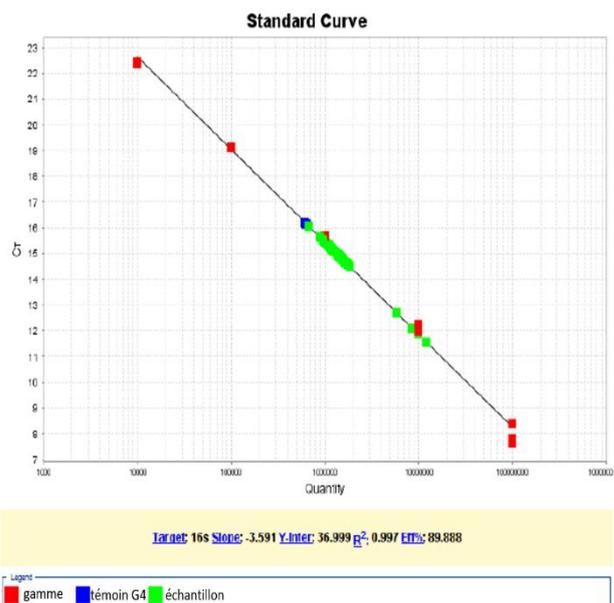


Figure 17 : Exemple de droite étalon obtenue par qPCR, ici la plaque du gène ARNr-16S.

Comme pour les biomasses, le test de normalité ne peut pas être effectué pour étudier la distribution des données au vu du faible nombre d'échantillons qui ne permettait pas de faire une ANOVA paramétrique. Le test de Kruskal-Wallis, qui est une ANOVA non-paramétrique, a été réalisé sur les ratios de qPCR et le résultat est exporté sous forme de graphique en box plot (Fig.18). De la même manière que les biomasses, les classes statistiques ont été obtenues par un test post-hoc avec une correction de Bonferroni.

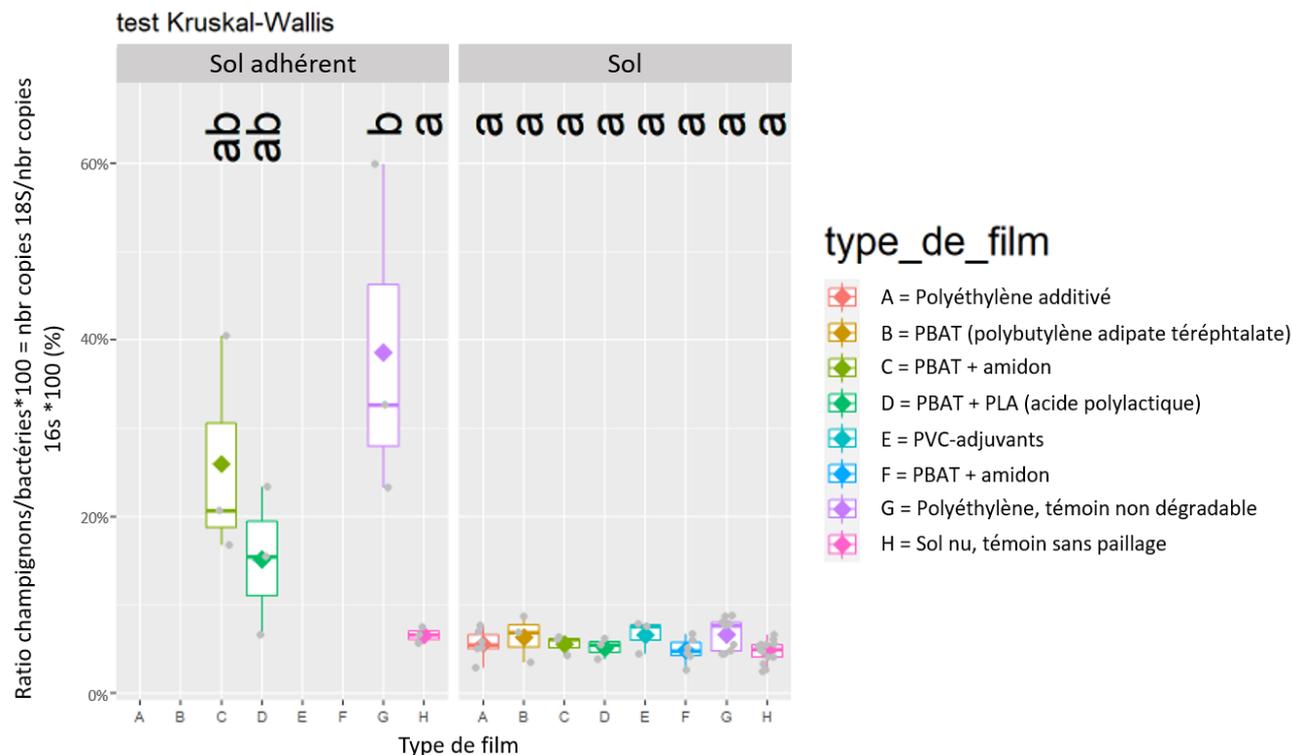


Figure 18 : Graphique du test non-paramétrique Kruskal-Wallis sur les ratios qPCR champignons/bactéries*100 suivant le type de paillage pour les prélèvements de sols et de sols adhérents.

En ce qui concerne les échantillons de sols, il n'y a pas de différence significative entre les ratios des différentes modalités de paillage avec des ratios (A, B, C, D, E, F, G) similaire à celui du sol nu (H), il ne semble donc pas y avoir d'impact du type de film sur l'équilibre microbien en profondeur sur le court terme (4 mois de paillage) ou sur du long terme (parcelles historiques P16 et P18).

Pour les échantillons de sol adhérent, le ratio moyen obtenu pour le sol nu est semblable à celui obtenu pour les prélèvements initiaux de sols. En revanche, pour les échantillons de sol adhérent aux films biodégradables C et D, les ratios champignons/bactéries*100 sont plus élevés que celui du sol nu et ceux des prélèvements de sol (0-20 cm). Pour les échantillons de sol adhérent au film non-dégradable (G), le ratio augmente significativement par rapport au sol nu et aux autres échantillons de sol 0-20 cm, de façon significative.

L'impact du type de film sur l'équilibre microbien dans les prélèvements de sol adhérents semble être significatif après un paillage de 4 mois.

4) Discussion

Suite aux tests statistiques effectués sur RStudio® avec les données de Biomasse Moléculaire Microbienne ainsi que les données de qPCR, il est important de noter que les valeurs obtenues avec un prélèvement de sol (profondeur 0-20 cm) sont similaires quels que soient les plastiques et les essais (long terme et nouveau dispositif). En effet, nous n'observons pas de différences entre le film de paillage non-dégradable (G), biodégradable (A, B, C, D, E et F) ou sans film de paillage avec un sol nu (H). Cela indiquerait que l'utilisation et l'enfouissement de films plastiques n'a pas d'effet significatif sur les valeurs mesurées. La quantité de biomasse est un indicateur habituellement de la quantité de carbone biodisponible dans le sol. Le ratio champignons/bactéries quant à lui permet de renseigner sur la qualité de ce carbone. En effet, un ratio élevé est dû à un carbone récalcitrant à la dégradation bactérienne alors qu'un ratio entre 0 et 10 % implique la présence d'un carbone facilement dégradé et donc accessible aux bactéries.

Toutefois, les analyses statistiques montrent des effets significatifs au bout de 4 mois de paillage, sur le sol adhérent au film de paillage sur l'équilibre microbien (qPCR). Au niveau de la biomasse, l'effet n'est pas significatif (la « p-value » obtenue au test Kruskal-Wallis étant de 0,07 ce qui est supérieur au seuil de 0,05). Il est observé une hausse des valeurs de biomasse sur les prélèvements de sol en contact des films biodégradables C et D. Afin de savoir si cet effet est réel, il serait intéressant de refaire une expérience en conditions contrôlées et avec plus de répétitions par modalité. En effet, une des hypothèses est que le carbone biodisponible de ces films peut servir de source de carbone aux communautés microbiennes. Effectivement, ces films sont composés notamment d'amidon, polymère de carbone, qui est une molécule métabolisée par les microorganismes. Cet apport de carbone peut avoir un impact positif mais transitoire car dépendant de la quantité de carbone disponible. De plus, la biomasse est un paramètre qui peut varier très rapidement dans le sol puisqu'une fois que la quantité de carbone a été consommé, la vie et le développement microscopique décroît, diminuant drastiquement cet indicateur. Cette relation entre carbone disponible et BMM peut expliquer qu'aucune différence n'est observée sur les parcelles historiques ayant reçu des films de paillage depuis 2001 jusqu'en 2015. La quantité de carbone apportée par le film n'est peut-être pas suffisante pour permettre d'observer un effet à l'échelle de la parcelle.

Au niveau de l'équilibre microbien par qPCR, un effet significatif du film non-dégradable (G) du sol adhérent est observé avec un accroissement du ratio champignons/bactéries (en %) au bout de 4 mois de paillage. Cette augmentation de la

quantité de champignons pourrait s'expliquer par le fait que le film est non-dégradable, composé de polyéthylène, qui est une chaîne complexe de carbone récalcitrant à la dégradation. Les champignons sont équipés au niveau de leur génome en gènes capables de dégrader les macromolécules carbonées complexes. L'augmentation de ce ratio est cohérente avec cette hypothèse en permettant le développement de communautés fongiques, au contact du film, capables de dégrader ce carbone récalcitrant via des enzymes que ne possèdent pas les bactéries. Les résultats d'analyses des communautés microbiennes au niveau taxonomique devraient permettre de valider ou non cette hypothèse.

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus jusqu'à présent dans le cadre du projet BIOMALEG montrent que l'utilisation de films de paillage, biodégradables ou non, a un impact non détectable au niveau de la parcelle, mais qu'un effet est observé au niveau de l'interface directe sol/film. Les résultats de l'impact des films de paillage utilisés ont une importance sociale forte, en effet, les utilisateurs de ces films font l'objet de pressions de groupe qui militent pour l'interdiction de ces films ou de leur retrait dans le cahier des charges de l'agriculture biologique. En conséquence, les résultats obtenus sont soumis à une anonymisation des films. Cependant, ces résultats ne permettent pas encore de déterminer si la diversité fonctionnelle est modifiée selon le type de film utilisé, la profondeur du sol et/ou la durée d'exposition. Les analyses bio-informatiques qui seront réalisées à partir des données de métabarcoding permettront possiblement d'identifier des phyla bactériens et fongiques pouvant avoir des voies métaboliques pouvant servir à la dégradation des films en molécules carbonées simples (la production d'amylases au contact des films composés d'amidon). La présente étude ne permet de ne travailler que sur l'impact des films de paillage sur un horizon 0-20 cm de profondeur. Le projet, se déroulant sur 3 ans, il sera donc intéressant de prélever des échantillons profonds et de voir l'évolution des indicateurs au fil du temps et après enfouissement des films biodégradables. Enfin, grâce aux données obtenues, il a été décidé, en concertation avec les membres porteurs du projet de réaliser par la suite des études fonctionnelles sur des microcosmes en plus de la métagénomique. En effet, il pourrait être intéressant d'étudier notamment les ARN messagers présents dans les sols et sols adhérents pour connaître les gènes et organismes impliqués dans la dégradation des films. Toutefois, cette étude nécessite de sélectionner uniquement certains échantillons au vu du coût de l'analyse, mais elle pose aussi des problèmes techniques pour la conservation des échantillons prélevés (tamisage, température de stockage, lyophilisation) ainsi que par l'infime présence d'ARNm vis-à-vis de la quantité d'ARN totaux que les protocoles permettent d'extraire.

Ce projet, auquel j'ai pu participer du prélèvement sur le terrain jusqu'au traitement des données représente seulement une partie des activités réalisées au cours de mon apprentissage. Tout au long de ce dernier, j'ai pu prendre part à différents projets divers avec des questions scientifiques différentes ainsi qu'à d'autres activités variées afin d'alimenter mes connaissances scientifiques et mon savoir-faire technique tout en participant activement à la gestion de la plateforme.

Par exemple, j'ai apporté mon soutien technique sur la partie diversité d'un projet nommé SYS-DIV visant à évaluer la biodiversité des sols et les services écosystémiques associés dans des systèmes de culture alternatifs et en transition en réalisant la préparation de librairies de produits PCR pour du séquençage NGS chez GeT-Plage. J'ai également pris en charge un projet externe à la plateforme en réalisant des analyses de qPCR des gènes codants les ARNr-16S et 18S sur des ADN qui nous ont été envoyés.

J'ai été amenée à réaliser de la veille technologique pour valider des nouvelles références de T4gp32 ou encore évaluer l'impact de changement d'un appareil pour l'analyse qPCR. J'ai également été en charge de l'adaptation du protocole de PCR ciblant le gène codant l'ARNr-16S en vue du séquençage chez GeT-Plage (cf. II/3 c.). J'ai aussi pu utiliser un nouvel appareil déployé au sein de la plateforme, la TapeStation 4500, pour l'adaptation de la PCR mais aussi pour une veille technologique visant à comparer deux protocoles de purification des ADN bruts. J'ai été impliquée dans la gestion de la plateforme, la gestion de la qualité et de la métrologie (dégivrage de congélateurs, participation au tri d'échantillons, réalisation de l'inventaire des consommables, réception des colis et leurs commandes, préparation d'échantillons de sols). Cet apprentissage m'a permis d'assister à une formation sur le séquençage NGS qui fut très enrichissante et de me rendre sur le terrain à Auray pour réaliser des prélèvements pour ce projet.

Références bibliographiques

- [1] Maron, P-A. - La diversité des communautés microbiennes, un levier pour piloter le fonctionnement biologique du sol (résumé) - *Actes du colloque, Carrefour de l'innovation agronomique* - (2018)
- [2] Ranjard, L., Dequiedt, S., Jolivet, C., Saby, N.P-A., Thioulouse, J., Harmand, J., et al. - Biogeography of soil microbial communities: review and description of the ongoing french national initiative - *Agronomy for Sustainable Development* **30**, 359-365 - (2010)
- [3] Lavelle, P., et V.Spain, Alister. - Soil ecology - Chapter 3 : Soil organisms - *Springer Science & Business Media*, - (2002)
- [4] Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., et al. - Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure - *14 International Symposium on Microbial Ecology (ISME 14)* - (2012)
- [5] Bourgeois, E. - Évaluation de la robustesse technique et scientifique d'un bioindicateur de la qualité microbiologique du sol, la Biomasse Moléculaire Microbienne. - [Thèse de doctorat] Université de Bourgogne - (2012)

Annexes

Annexe 1 : Composition du tube d'extraction contenant les billes ainsi que du tampon d'extraction pour un échantillon (5mL)

Tableau 2 : Composition du tube de billes pour un échantillon.

Type de billes	Quantité par échantillon
Billes de verre de 4 mm	4 billes
Billes de céramique de 1,4 mm	2,5 g
Billes de silice de 100 µm	2 g

Tableau 3 : Composition du tampon d'extraction pour un échantillon (5mL).

Composants	Volume par échantillon	Type, rôle
Tris HCl 1M pH8	0,5 mL	Solution tampon qui permet de garder un pH constant
EDTA 0,5M pH8	1 mL	Acide, chélateur de cations (Ca ²⁺ et Mg ²⁺)
NaCl 58,4g/L	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

Annexe 2 : Point sécurité :

Tableau 4 : Produits, étapes dangereuses, dangers et protections mises en place.

Produits	Etapes	Dangers	Protections (risques associés)
Acétate de potassium	Extraction d'ADN	Irritant	Blouse, gants (contact cutané)
BET (Bromure d'éthidium)	Coloration gel d'agarose	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 spécifique des déchets

Billes de silice (volatil)	Extraction d'ADN	Irritant	Blouse, gants (contact cutané) Masque anti-poussières (inhalation) Lunettes (contact oculaire)
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)	Extraction d'ADN	Irritant	Blouse, gants (contact cutané)
Ethanol	Extraction d'ADN	Irritant et inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaire) Travail sous sorbonne (inhalation de vapeur)
Isopropanol	Extraction d'ADN	Irritant et inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaire)
Quantifluor/picogreen	Dosage fluorométrique	Cancérogène, mutagène, reprotoxique	Blouse, gants (contact cutané) Travail sous hotte avec matériel dédié
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Extraction d'ADN	Irritant	Blouse, gants (contact cutané)
Solution SB Guanidinium thiocyanate 30-60%	Purification d'ADN	Irritant	Blouse, gants (contact cutané)
Solution SW1 Guanidine hydroxychloride 36-50% + Isopropanol	Purification d'ADN	Irritant et inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaire) Travail sous sorbonne (inhalation de vapeur)
Solution SW2 + ajout d'éthanol	Purification d'ADN	Irritant et inflammable	Blouse, gants (contact cutané) Lunettes (contact oculaire) Travail sous sorbonne (inhalation de vapeur)
SybrGreen (Takyon)	qPCR	Cancérogène, mutagène, reprotoxique	Blouse, gants (contact cutané) Travail sous hotte aspirante spéciale PCR Travail avec du matériel dédié Elimination spécifique des déchets
TBE (Tris + EDTA + Acide borique)	BMM et électrophorèse	Reprotoxique, corrosif, irritant	Blouse, gants (contact cutané) Travail avec du matériel dédié
Tris (Trisma Base, Tris[hydroxyméthyl]amino méthane)	Extraction d'ADN	Irritant	Blouse, gants (contact cutané)

Annexe 3 : Niveaux d'habilitations de la plateforme pour la salle BET :

Tableau 5 : Description des 3 niveaux d'habilitation de la salle BET (pour ma part, je suis habilitée niveau 2).

Niveau	Description
1	Accès simple, utilisateur. Le personnel accédant à cette salle est formé par un membre habilité niveau 2 ou 3 du LADM.
2	Le personnel habilité de niveau est formé à l'entretien de la salle et des baignoires de BET et est capable de former le personnel de niveau 1.
3	Personnel formé et permanent ayant en charge la formation du personnel pour les niveaux 1 et 2.

Annexe 4 : Composition du mix pour la qPCR :

Tableau 6 : Composition du mix qPCR et rôles des composants.

Composants		Rôles	Volumes pour 1 puit de 13µL (en µL)	Quantité finale dans le puit
Amorces		Séquences de nucléotides monocaténaire, 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 µM (pour chacune des deux amorces)
T4 apligene		Enzyme permettant de limiter l'action d'inhibiteur en protégeant la Taq et en gardant ouvert les brins d'ADN	0,75	0,500µg
Master Mix SybrGreen Takyon	Taq polymerase	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 le mix en plus pour la 18S uniquement)	Cation (ion chargé positivement) qui est un cofacteur enzymatique, essentiel au bon fonctionnement de la Taq		
Eau ultra-pure		Diluant	1,75	-