

ECOMIC-RMQS : biogéographie microbienne à l'échelle de la France

Etat d'avancement et premiers résultats

S. Dequiedt₍₁₎₍₂₎, M. Lelièvre₍₁₎₍₂₎, C. Jolivet₍₃₎, N.P.A. Saby₍₃₎, M. Martin₍₃₎, J. Thioulouse₍₄₎, P.A. Maron₍₁₎₍₂₎, C. Mougél₍₁₎₍₂₎, N. Chemidlin Prévost-Bouré₍₁₎, D. Arrouays₍₃₎, P. Lemanceau₍₁₎₍₂₎ et L. Ranjard₍₁₎₍₂₎

- 1) INRA-Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, CMSE, 17, rue Sully, B.V. 86510, 21065 Dijon cedex, France
- 2) Plateforme GenoSol, INRA-Université de Bourgogne, CMSE, 17, rue Sully, B.V. 86510, 21065 Dijon cedex, France
- 3) INRA Orléans, Unité InfoSol, US 1106, CS 40001, Ardon, 45075, Orléans cedex 2, France
- 4) Université de Lyon, F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR555, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France

RÉSUMÉ

Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS = réseau de surveillance français de la qualité des sols coordonné par l'unité InfoSol de l'INRA d'Orléans - GISSOL) repose sur une grille d'échantillonnage systématique (16 x 16 km) couvrant l'ensemble du territoire français, soit un total de 2200 échantillons de sols prélevés sous différentes conditions environnementales (caractéristiques pédo-climatiques, mode d'occupation des sols...). Ce réseau constitue un bon outil d'évaluation et de suivi de la qualité des sols et de caractérisation des niveaux de contamination. Le but du programme ECOMIC-RMQS est de faire l'inventaire et d'étudier la diversité bactérienne, à l'échelle du territoire français, dans les sols du RMQS. Des outils d'écologie microbienne moléculaire sont appliqués à partir de l'ADN extrait directement dans les sols. Le rendement d'extraction de l'ADN est quantifié et la structure génétique des communautés bactériennes est approchée par la méthode ARISA (= empreinte moléculaire). En parallèle, des outils statistiques et mathématiques sont développés afin d'évaluer et de déterminer les relations entre la diversité microbienne et les paramètres pédologiques, le mode d'occupation des terres, les pratiques agricoles, le climat, la diversité végétale... L'utilisation des techniques de géostatistiques permet également de dresser des cartes de répartition des paramètres étudiés et d'aborder les profils de distribution géographique. L'analyse des premiers résultats montre l'influence des caractéristiques des sols sur la densité microbienne ainsi qu'une structuration dans l'espace de la structure génétique des communautés bactériennes.

Mots clés

ADN de sol, diversité et densité microbienne, biogéographie microbienne.

SUMMARY**ECOMIC-RMQS: MICROBIAL BIOGEOGRAPHY AT THE SCALE OF THE FRENCH TERRITORY:****Progress Status and first results**

The "Réseau de Mesures de la Qualité des Sols" (RMQS = French Soil Quality Monitoring Network co-ordinated by INFOSOL unit of INRA Orléans - Gissol) consists on a systematic grid (16 x 16 km) covering the whole French territory with a total of 2200 soil samples under different environmental conditions (pedo-climatic characteristics, land-use...). This network provides a good descriptor and predictor of soil quality and characterization of diffuse contaminations. The aim of the ECOMIC-RMQS project is the inventory and the study of the bacterial diversity, at the scale of the French territory, by using the soils samples of the RMQS. Molecular tools are applied on the DNA extracted directly from the soil. DNA yield is quantified and the genetic structure of bacteria is approached by ARISA (fingerprinting technique). Statistical and mathematical tools are developed to evaluate and determine the relationships between the microbial diversity and the pedological parameters, the land-use, the agricultural practices, the climatic conditions, the floristic diversity... Geostatistics tools are used to map the microbial diversity in French soils and to define geographic patterns. Our first results show the influence of soils parameters on microbial density and geographic patterns of bacterial genetic structure.

Key-words

DNA, microbial diversity and density, microbial-biogeography.

RESUMEN**BIOGEOGRAFÍA MICROBIANA A ESCALA DE FRANCIA : Estado de adelantado y primeros resultados**

La Red de Medidas de la Calidad de los Suelos (RMQS = red de vigilancia francesa de la calidad de los suelos coordinada por la unidad Infosol de INRA Orleans - GISSOL) se basa en una rejilla de muestreo sistemático (16 x 16 km) que cubre la totalidad del territorio francés; o sea un total de 2200 muestras de suelos tomadas bajo diferentes condiciones de medio ambiente (características pedo-climáticas, tipo de uso del suelo...). Esta red constituye una buena herramienta de evaluación y de seguimiento de la calidad de los suelos y de caracterización de los niveles de contaminación. El objetivo del programa ECOMIC-RMQS está hacer el inventario y estudiar la diversidad bacteriana, a escala del territorio francés, en los suelos de RMQS. Se aplican herramientas de ecología microbiana molecular a partir del ADN extraído directamente de los suelos. Se cuantifica el rendimiento de la extracción del ADN y se acerca la estructura genética de las comunidades bacterianas por el método ARISA (= impresión molecular). En paralelo, se desarrollan herramientas estadísticas y matemáticas para evaluar y determinar las relaciones entre la diversidad microbiana y los parámetros pedológicos, el tipo de ocupación de las tierras, las prácticas agrícolas, el clima, la diversidad vegetal... El uso de las técnicas de geoestadística permite igualmente elaborar mapas de repartición de los parámetros estudiados y abordar perfiles de distribución geográfica. El análisis de los primeros resultados muestra la influencia de las características de los suelos sobre la densidad microbiana así que una estructuración en el espacio de la estructura genética de las comunidades bacterianas.

Palabras clave

ADN del suelo, diversidad y densidad microbiana, biogeografía microbiana.

Longtemps considéré par les décideurs et les usagers comme un simple support à la production agricole ou à la construction, le sol vient aujourd'hui au centre des préoccupations de notre société dans un contexte de prise en compte du développement durable. De par sa position d'interface au sein de la biosphère, le sol joue un rôle clé dans la qualité de l'environnement. En effet, il intervient notamment dans la régulation des principaux flux de matière et d'énergie entre l'hydrosphère et l'atmosphère et assure un certain nombre de services écosystémiques (rôle de puits ou source des gaz à effet de serre, lutte contre les inondations en tant que réservoir tampon, réservoir et fournisseur des éléments nutritifs nécessaires à la production agricole...). D'un point de vue écologique il n'est plus à démontrer que le sol représente également l'un des plus importants réservoirs de diversité biologique de notre planète et, surtout, le dernier refuge pour cette biodiversité (Swift, 1999).

Dans ce contexte, le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS - Arrouays *et al.*, 2003; Jolivet *et al.*, 2006) a été mis en place afin de constituer un cadre national pour l'observation de l'évolution de la qualité des sols. Il répond au besoin de disposer de données quantitatives sur l'état des sols en France. Ce réseau systématique de mesures et de suivi des paramètres des sols a pour objectif de détecter de façon précoce l'apparition et les tendances de la dégradation de l'état des sols en mesurant dans un premier temps un certain nombre de paramètres physiques et chimiques. Sa mise en place permet en outre de mettre au point ou d'améliorer les indicateurs de la qualité des sols pouvant servir d'outils d'aide à la décision pour les acteurs potentiels (agriculteurs, gestionnaires des ressources naturelles, etc.), afin d'assurer une gestion durable de la ressource en sol. Dans la plupart des pays européens, il existe des réseaux de surveillance des sols de ce type; ils consistent en une détermination systématique des caractéristiques des sols et de leurs variations temporelle et spatiale à grande échelle (Morvan *et al.*, 2008; Gardi *et al.*, 2009). Toutefois, la plupart ne prennent en considération que les paramètres pédoclimatiques des sols sans aucune intégration de paramètres biologiques et encore moins de la diversité des microorganismes indigènes.

Pourtant, les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement du sol: dynamique des matières organiques et cycles du carbone et de l'azote, bio-disponibilité des éléments nutritifs, dégradation de polluants organiques, rétention de polluants métalliques, action sur la structure des sols, etc. Par ailleurs, au sein de la biocénose des sols, ils représentent les organismes les plus abondants et les plus diversifiés d'un point de vue taxonomique et fonctionnel (Torsvik *et al.*, 2002). Réciproquement, les communautés de micro-organismes sont susceptibles d'intégrer rapidement l'ensemble des stress environnementaux touchant le sol. De ce fait, elles apparaissent à cet égard comme de bons indicateurs précoces de l'évolution de la qualité des sols (Bressan *et al.*, 2008).

Ces considérations s'intègrent parfaitement dans la réflexion récente menée par un collège scientifique international qui a proposé de considérer les communautés microbiennes comme un modèle générique en écologie afin de tester et valider les concepts qui régissent l'évolution du monde vivant et de sa biodiversité et, par conséquent, la qualité de notre environnement (Jessup *et al.*, 2004). De plus, dans un contexte scientifico-socio-politique, la biodiversité est au centre des débats et notamment en France, au cœur du Grenelle de l'environnement. La conférence tenue à Paris en janvier 2005 et intitulée « Biodiversité science et gouvernance » a mis en relief les objectifs prioritaires à initier ou renforcer. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter: i) caractériser et évaluer la biodiversité grâce à des dispositifs d'observation, ii) comprendre sa dynamique et ses changements par l'émergence de modèles, et iii) évaluer les impacts des changements de biodiversité. Chez les macro-organismes, la diversité *beta* (comment la composition de la communauté évolue à l'échelle du paysage) est étudiée et décrite depuis longtemps. Son importance est reconnue et identifiée comme centrale dans la compréhension des facteurs environnements influençant les variations de la biodiversité et leur amplitude. Malgré le fait que les modèles de distribution spatiale de la diversité microbienne peuvent avoir des conséquences importantes sur la structuration des communautés de plantes et le fonctionnement de l'écosystème, l'étude de la diversité *beta* des communautés microbiennes et son suivi temporel n'ont été que peu étudiés (Horner-Devine *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2004). De plus, les études en écologie microbienne ne considèrent souvent qu'une investigation à l'échelle de l'agrégat (Ranjard *et al.*, 2000a; Dechesne *et al.*, 2003) ou à l'échelle de la parcelle (Felske et Akkerman, 1998). Par conséquent, les résultats sont souvent difficilement comparables et étroitement dépendant du site étudié. Ils sont donc généralement peu extrapolables, ce qui confère un manque de généralité pour la connaissance des micro-organismes des sols et de leur fonctionnement.

De ce fait, le programme ECOMIC-RMQS s'intègre tout à fait dans ce contexte en proposant de caractériser les communautés microbiennes indigènes des sols échantillonnés dans le RMQS. L'intégration des caractéristiques physiques, chimiques et microbiologiques d'échantillons de sols distribués sur un grand territoire (national) n'a jamais été appréhendée au niveau international. Dans ce contexte, la collection de sols du RMQS constitue une base exceptionnelle pour réaliser ce type d'étude. Le projet ECOMIC-RMQS permet donc d'étudier la distribution spatiale des communautés de microorganismes et de fournir un référentiel d'interprétation à l'échelle du territoire français (grâce à la fonction d'inventaire que fournit le RMQS) qui permettra de conférer un caractère plus générique aux études portant sur l'évaluation de la biodiversité microbienne et la compréhension de sa régulation.

Dans ce projet, la diversité bactérienne est abordée essentiellement par des outils moléculaires. Ces 20 dernières années, les développements importants en biologie

moléculaire ont débouché sur la mise au point de techniques d'écologie moléculaire qui permettent d'évaluer l'abondance et d'appréhender la structure génétique (génotypage) et la diversité (pyroséquençage des gènes taxonomiques) des communautés microbiennes *in situ*, directement à partir de l'ADN extrait du sol (Ranjard *et al.*, 2000b). Ces techniques sont actuellement optimisées, automatisées et donc réalisables en routine (moyen débit) au sein du laboratoire porteur du projet (UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement, Dijon). L'objectif est de décrire et d'étudier la biogéographie des communautés microbiennes à l'échelle d'un territoire dans son ensemble et, plus généralement de déterminer les paramètres influençant la diversité microbienne des sols et l'impact des activités anthropiques sur celle-ci.

STRATEGIES ET METHODES

Stratégie d'échantillonnage

Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS) repose sur le suivi d'environ 2200 sites de prélèvement répartis uniformément sur le territoire français, selon une grille systématique de maille carrée de 16 km de côté (*figure 1*). Ce dispositif de surveillance est conçu de façon à être représentatif des grands types de pédopaysages afin de pouvoir évaluer les dégradations actuelles et futures des sols. Il est le fruit d'un partenariat multi-institutionnel (Ministères de l'Agriculture et de l'Environnement, Ademe, IFN, INRA, IRD) dans le cadre du Groupement d'Intérêt Scientifique Sol (GIS Sol) et est géré par l'Unité InfoSol de l'INRA d'Orléans.

Au centre de chaque maille de 16 km, un dispositif de prélèvement de sols, qui sera renouvelé tous les 10 ans, est mis en place. Ce dispositif comprend (*figure 1*) : i) une fosse pédologique permettant la description du sol et la collecte d'échantillons de chaque horizon décrit, ii) une surface d'échantillonnage de 400 m². La surface d'échantillonnage permet la collecte répétée d'échantillons composites au fil du temps. Le plan d'échantillonnage est de type aléatoire stratifié. Son principe est le suivant : lors de la première campagne de mesures, les 25 unités d'échantillonnage portant le numéro 1 sont échantillonnées. Lors des campagnes ultérieures, les échantillons seront prélevés au sein des unités d'échantillonnage portant les numéros 2, 3 puis 4. Dans chaque unité d'échantillonnage, l'emplacement du prélèvement est choisi aléatoirement. Les 25 échantillons, prélevés à la tarière, sont ensuite mélangés de façon à constituer un échantillon composite. Cette opération est réalisée dans la couche de surface du sol (0-30 cm ou couche de sol labourée) puis, si l'épaisseur du sol le permet, dans la couche sous-jacente (30-50 cm). De nombreuses autres observations sont réalisées sur chaque site : géopositionnement GPS du dispositif, description de l'environnement du site, description de la végétation présente sur les parcelles non travaillées, enquête sur l'historique et les

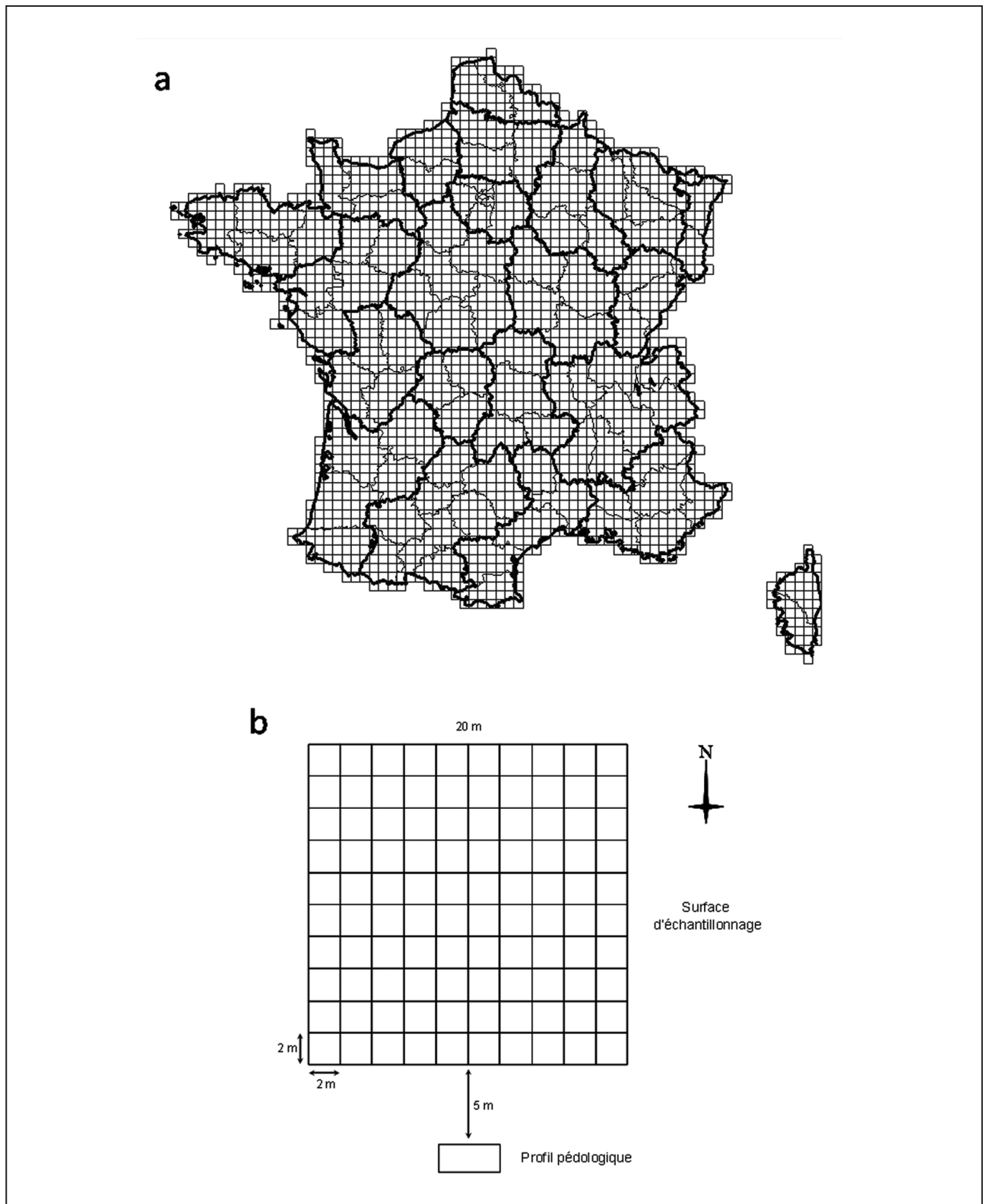
modalités de gestion de la parcelle. L'ensemble de ces variables permet de disposer d'indicateurs du degré d'évolution des sols et de l'intensité des dégradations éventuellement subies par les sols. L'ensemble des données décrivant les sites est codé et stocké dans la base de données Donesol. Les échantillons composites sont préparés et séchés selon des procédures basées sur les normes Afnor et ISO. Un sous-échantillon est envoyé au Laboratoire d'Analyses de Sols de l'INRA d'Arras, pour les analyses physico-chimiques. Le reste de l'échantillon est archivé au Conservatoire des Sols de l'INRA d'Orléans.

Les échantillons composites prélevés dans la première couche de la surface d'échantillonnage sont utilisés pour l'étude de la composante microbienne dans le cadre du programme ECOMIC-RMQS. Ils sont fournis par l'Unité InfoSol, partenaire du programme, dans les conditions de stockage pratiquées pour les analyses pédologiques (i.e. sol séché à l'air et tamisé à 2 mm).

Stratégie logistique

La plateforme GenoSol http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/ a été créée en 2008 au sein de l'Unité Mixte de Recherche en Microbiologie du Sol et de l'Environnement de l'INRA de Dijon. Son montage a été initié en réponse au programme ECOMIC-RMQS au vu du nombre d'échantillons à gérer et de données à traiter. Son objectif est de fournir une structure logistique assurant l'acquisition, la conservation, la caractérisation et la mise à disposition des ADN de sols et des données associées issues des échantillonnages de grande ampleur (plusieurs centaines à plusieurs milliers correspondant à de grandes échelles spatiales et/ou temporelles). Cette plateforme a pour mission d'établir un véritable référentiel des caractérisations moléculaires microbiennes (taxonomiques et fonctionnelles) sur les sols ainsi que des interprétations de ces analyses à grande échelle (dans le temps et l'espace). En qualité de Centre de Ressources Biologiques de Sols, la plateforme est un outil structurant qui se positionne comme le Conservatoire National des Ressources Génétiques microbienne du sol. Les sols y sont archivés et cryo-conservés (-40 °C) afin de stabiliser leur état biologique et de permettre des analyses ultérieures complémentaires comparables. La plateforme propose, aux unités de recherche intéressées, d'assurer le soutien logistique et technique dans des programmes impliquant de grands échantillonnages (RMQS, Observatoire Régionaux en Environnement). Le but est de faire le lien entre les équipes de recherches et les gestionnaires de sites d'échantillonnage. La mutualisation des sols, des ADNs et des données au sein de la plateforme GenoSol permet aux équipes de recherche de travailler sur les mêmes matrices nucléiques ce qui renforce la robustesse et l'extrapolation des données obtenues. La sauvegarde des données issues de ces programmes au sein de la base de données « MicroSol » de la plateforme, qui permet d'éviter leur perte ou leur simple exploitation à court terme, est aussi un atout pour les équipes de recherche. La centralisation des échantillons, mais aussi des résultats associés, représente le

Figure 1: Grille de prélèvement du RMQS à l'échelle du territoire français (a) et à l'échelle du site de prélèvement (b).
Figure 1: Map of the RMQS samples grid at the scale of the French territory (a) and at the scale of the sampled site (b).



cœur du référentiel d'interprétation et d'analyse que constitue la plateforme GenoSol. L'ensemble des savoir-faire, des sols, des données générées et des outils mathématiques associés est mis à la disposition de la communauté scientifique nationale et internationale dans le but d'augmenter la généricité des études en écologie microbienne des sols (Ranjard *et al.*, 2009).

Dans le cadre du programme ECOMIC-RMQS, la plateforme fournit l'appui logistique pour la gestion et la conservation des échantillons de sols et des ADN associés. Les sols du RMQS fournis par le Conservatoire des Sols de l'INRA d'Orléans (50 g environ) sont archivés et mis en conservatoire à - 40 °C.

Stratégie analytique

Les approches moléculaires utilisées dans ce projet sont basées sur l'extraction de l'information génétique (ADN) du sol et la caractérisation des séquences bactériennes directement à partir de cette matrice d'acides nucléiques. Ces méthodes présentent l'avantage de s'affranchir des biais liés à la culture des micro-organismes telluriques dont on estime souvent que seulement 0,1 à 10 % d'entre eux sont cultivables sur des milieux synthétiques. La possibilité de caractériser la diversité microbienne sur des sols archivés depuis 1950 a récemment été démontrée et proposée comme outil de suivi des sols (Dolfing *et al.*, 2004). Ces auteurs ont montré, pour une même parcelle agronomique, une évolution de la biodiversité de la communauté microbienne entre 1950 et 1974, évolution qui semble être en relation directe avec le type de fertilisation utilisée (organique vs minérale). D'un point de vue technique, ces travaux démontrent aussi la faisabilité d'utiliser des outils moléculaires sur des sols conservés séchés puisque la discrimination des communautés microbiennes reste robuste et semble plus sensible aux variations des conditions environnementales qu'aux conditions de stockage du sol. Ces travaux valident l'approche moléculaire pour la caractérisation des communautés bactériennes sur les sols séchés du RMQS. L'Unité Mixte de Recherche en Microbiologie du Sol et de l'Environnement de l'INRA de Dijon est coordinatrice du programme; elle assure l'acquisition des données microbiologiques (rendement d'extraction d'ADN et structure génétique des communautés bactériennes).

Extraction des acides nucléiques des microorganismes du sol

La méthodologie retenue permet, depuis le sol, l'extraction directe de l'ADN contenu dans les organismes microbiens (bactéries et champignons). Le protocole est en cours de normalisation (Afnor et ISO) (Martin-Laurent *et al.*, 2001; Ranjard *et al.*, 2003) et permet d'obtenir un ADN de sol de haute qualité moléculaire (en termes de pureté et de représentativité). Le protocole fait appel à une lyse chimique et mécanique dans un tampon d'extraction. La purification des acides nucléiques (afin d'éliminer les solutés organiques co-extraits) est réalisée successivement par colonnes

d'exclusion et d'affinité. La quantification de l'ADN se fait par i) migration dans un gel d'Agarose (1 %), ii) coloration au Bromure d'ETHidium (B.E.T.) et iii) révélation sous fluorescence UV par comparaison avec une gamme d'ADN. La mesure est effectuée avant et après purification. La quantité d'ADN avant purification est la plus représentative de la quantité d'ADN totale contenue dans le sol; elle sert donc de base aux analyses statistiques et géostatistiques, et est mise en regard d'une quantité de biomasse microbienne au sein de ces sols. Cette méthode a été déjà éprouvée, elle limite les biais liés aux impuretés qui ont pu être co-extraites et qui peuvent altérer la quantification (Ranjard *et al.*, 1998). La quantité d'ADN après purification sert à calibrer les volumes à incrémenter dans les analyses moléculaires qui font suite.

Caractérisation de la structure génétique des communautés bactériennes indigènes des sols

L'analyse de la structure génétique des communautés bactériennes est effectuée par la technique d'empreinte moléculaire « B-ARISA » (pour Bacterial-Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, Ranjard *et al.*, 2000b) directement à partir de l'ADN extrait des sols. Cette technique repose sur l'analyse du polymorphisme de taille de l'intergène 16S-23S de l'opéron ribosomique bactérien. Elle présente une très bonne robustesse, sensibilité et reproductibilité méthodologique. La séparation des fragments d'ADN se fait par migration électrophorétique automatisée sur séquenceur à gel de type Li-Cor® (Ranjard *et al.*, 2003). Elle fournit des profils de bandes complexes qui sont spécifiques de la diversité et de la composition de chaque communauté étudiée. Les profils obtenus sont analysés en termes de présence/absence et intensité relative des populations bactériennes majoritaires. La méthode permet de mettre en évidence et d'interpréter des modifications dynamiques ou spatiales des structure génétiques des communautés bactériennes et fongiques d'un sol (Ranjard *et al.*, 2003).

Stratégie mathématique

Les analyses mathématiques des données générées dans le cadre du projet sont réalisées en partenariat avec les statisticiens du Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive (CNRS Lyon) et de l'Unité InfoSol (INRA Orléans). Les données biologiques sont obtenues par quantification du rendement d'extraction (assimilé à une biomasse microbienne des sols) et par méthode ARI-SA (structure génétique des communautés microbiennes). Pour chaque site de prélèvement, un ensemble de variables environnementales et descriptives est mesuré ou évalué: caractérisation physico-chimique complète du sol, climat du site, relevés floristiques. L'activité humaine, présente ou passée, est également renseignée (occupation, modes de cultures, rendements, travail du sol, amendements organiques, traitements phytosanitaires, etc.).

Les approches par analyses multivariées se révèlent bien appropriées pour confronter les données biologiques aux variables environnementales. Ces analyses s'effectuent sous environnement R (R Development Core Team, 2008; package *ade4* - Thioulouse *et al.*, 1997; package *spdep* - Bivand *et al.*, 2008) et des fonctions adaptées (package *prepRISA*). L'analyse en co-inertie (Dray *et al.*, 2003) permet en outre de s'astreindre des problèmes de colinéarité entre variables et de confronter des tableaux présentant un grand nombre de descripteurs. Elle permettra d'identifier les relations entre les communautés microbiennes et les variables de l'environnement. L'objectif se veut descriptif i) en hiérarchisant les paramètres pédo-climatiques en tant que déterminants de la variabilité de ces communautés et ii) en quantifiant l'impact de certaines pressions anthropiques (agricoles, industrielles ou urbaines...).

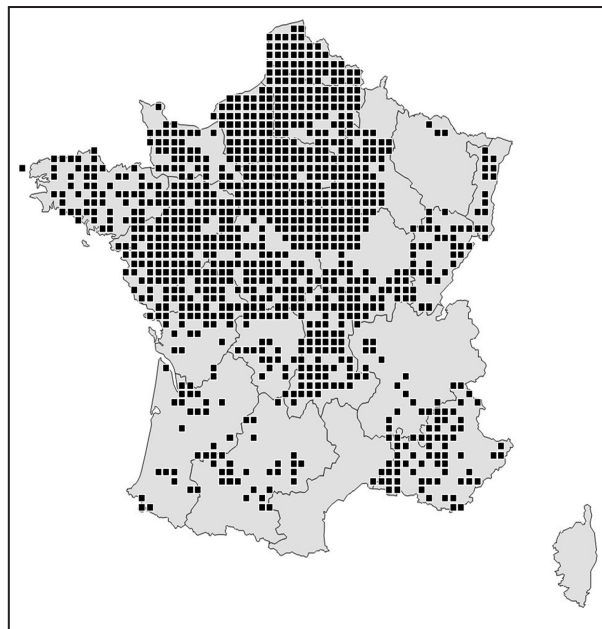
L'approche spatiale retenue lors de la genèse du projet RMQS est conservée dans le cadre de l'étude de la composante microbienne. Le concept de microbio-géographie (Martiny *et al.*, 2006), c'est-à-dire comment se distribuent les communautés microbiennes dans l'espace et quels sont les processus qui sous-tendent ces structures spatiales, sera abordé par deux approches. En premier lieu, les distributions spatiales des données biologiques, des variables environnementales et de leurs relations seront décrites par des méthodes multivariées tenant compte de l'information spatiale à travers une relation de voisinage (Dray *et al.*, 2003). En second lieu, les méthodes de géostatistiques permettront d'étudier l'échelle des dépendances spatiales entre les données mesurées ainsi que les relations entre l'environnement et les communautés microbiennes. Ces deux approches complémentaires seront appliquées afin de définir des zones homogènes sur le territoire en termes de communautés microbiennes et d'étudier le déterminisme de ces similarités.

ÉTAT D'AVANCEMENT

Le présent article fait état de l'avancée du projet et des données générées dans le cadre du programme bio-indicateurs financé par l'ADEME. Ce financement a permis d'initier le développement méthodologique et logistique associé à une étude de cette ampleur et de montrer sa faisabilité. Dans ce contexte, la relation entre l'unité InfoSol et l'unité Microbiologie du Sol et de l'Environnement a été établie. La campagne de prélèvement des sols sur les différents sites RMQS a démarré en 2001. 600 sites étaient déjà disponibles en 2006, date de commencement du programme ECOMIC-RMQS. En fin de projet bio-indicateurs de l'ADEME, 1 016 sols avaient été transmis au laboratoire d'écologie microbienne et l'ADN microbien de ces sols a été extrait (*figure 2*). Deux cent quatre-vingt-onze profils bactériens des communautés (B-ARISA) ont été obtenus. Les premières analyses statistiques ont été adaptées et appliquées aux résultats disponibles.

Figure 2: Etat d'avancement des analyses microbiologiques à la fin du programme Bio-indicateurs de l'ADEME (1 016 sites).

Figure 2: State of progress of microbiological analysis at the end of the Bio-indicators ADEME project (1 016 sites).



PREMIERS RÉSULTATS

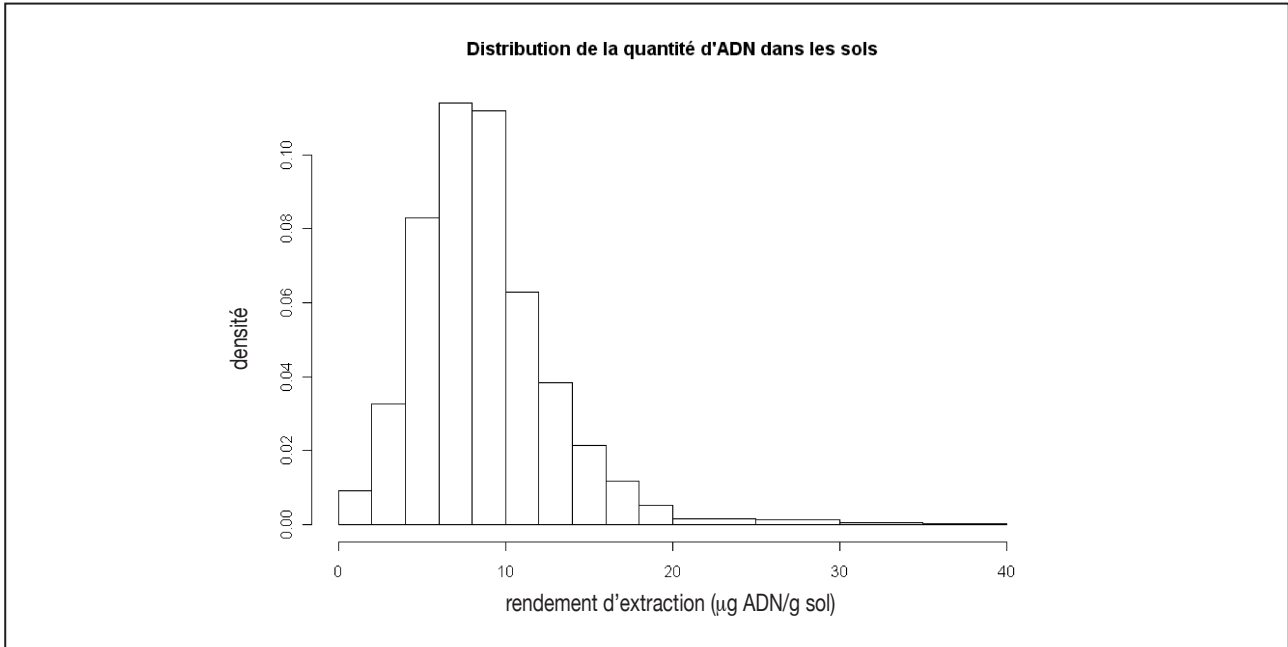
Rendement d'extraction (= Biomasse microbienne)

L'ADN des 1 016 sols du RMQS disponibles a été extrait et le rendement d'extraction quantifié. La gamme de valeurs mesurées s'étend de 0,1 à 41,1 μg d'ADN par gramme de sol sec pour une moyenne de 8,9 μg d'ADN/g de sol (*figure 3*). La moitié des sols présentent une quantité d'ADN entre 6,0 (1^{er} quartile) et 10,8 μg ADN/g de sol (3^e quartile). Ces résultats sont dans le même ordre de grandeur que ceux obtenus dans différents sols dont l'ADN est extrait suivant divers protocoles (Zhou *et al.*, 1996; Kuske *et al.*, 1998; Frostegard *et al.*, 1999; Ranjard *et al.*, 2003).

Les travaux de Zhou *et al.* (1996) révèlent que le rendement d'extraction peut varier en fonction des caractéristiques de la matrice sol. Afin d'évaluer l'influence du type de sol sur le rendement d'extraction, nous avons confronté le rendement d'extraction de 977 sols avec les données physico-chimiques de ces sols disponibles dans la base de données Donesol (Arrouays *et al.*, 2003). L'analyse statistique a été réalisée par Analyse en Composantes Principales avec, notamment, la représentation des descripteurs sur un cercle de corrélation (*figure 4*). Le rendement d'extraction a été ajouté en variable complémentaire. Les

Figure 3: Distribution du rendement d'extraction de l'ADN (1 016 sols).

Figure 3: DNA yield distribution (1 016 soils).



résultats révèlent qu'il est fortement corrélé à la CEC, à la teneur en argile des sols et au calcium échangeable. Ces constats sont en accord avec une plus grande valeur de biomasse microbienne estimée par d'autres méthodes dans les sols argileux (Ranjard *et al.*, 1997; Bru *et al.*, 2007). Ces résultats renforcent les études antérieures en écologie des sols qui constataient que les sols à texture fine conféraient un habitat plus favorable à la vie microbienne, notamment de par une meilleure protection contre la dessiccation, une meilleure diffusion des gaz et une meilleure disponibilité du carbone et de l'azote, ressources nécessaires pour les micro-organismes (Hattori and Hattori, 1976; Ranjard *et al.*, 2001; Foster, 1988).

Indépendamment des caractéristiques physico-chimiques des sols, le rendement d'extraction a été mis en relation avec le mode d'occupation des sols. Cette information est stockée dans la base Donesol sous la forme d'un codage emboîté de type Corine Land Cover (Heymann *et al.*, 1994). Les valeurs de rendement d'extraction ont été confrontées au niveau 1 du codage du mode d'occupation des sols. Ce niveau correspond à une approche très grossière de l'occupation des sols par l'activité humaine en organisant 6 grandes classes: Grandes Cultures, Forêts, Friches, Milieux Naturels, Prairies et Vignes & Vergers. Les niveaux inférieurs amènent un degré de précision plus fin mais ne sont pas étudiés ici au vu du faible nombre de résultats. Le test de Kruskal-Wallis (comparaison des moyennes de rangs) révèle des différences significatives au seuil de 5 % en fonction des modes d'occupation des sols (*figure 5*). Des tests

Figure 4: Ordination sur un plan factoriel (ACP) des caractéristiques de sol et du rendement d'extraction d'ADN.

Figure 4: PCA ordination map of soils characteristics and DNA yield.

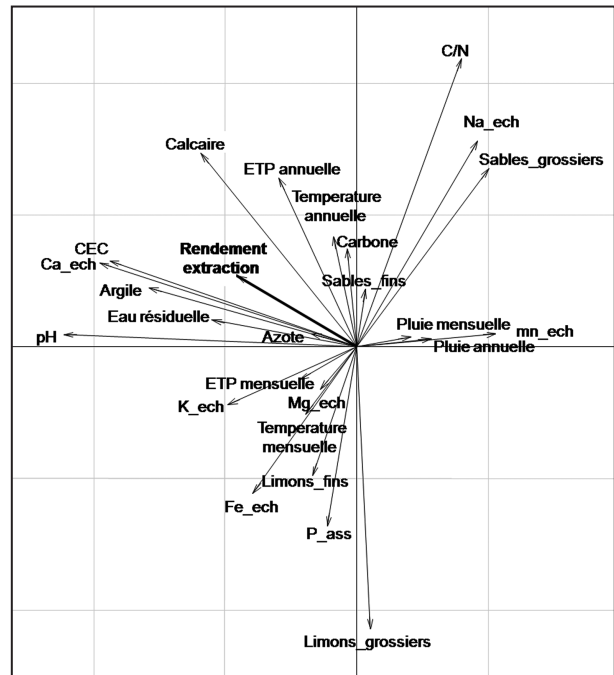
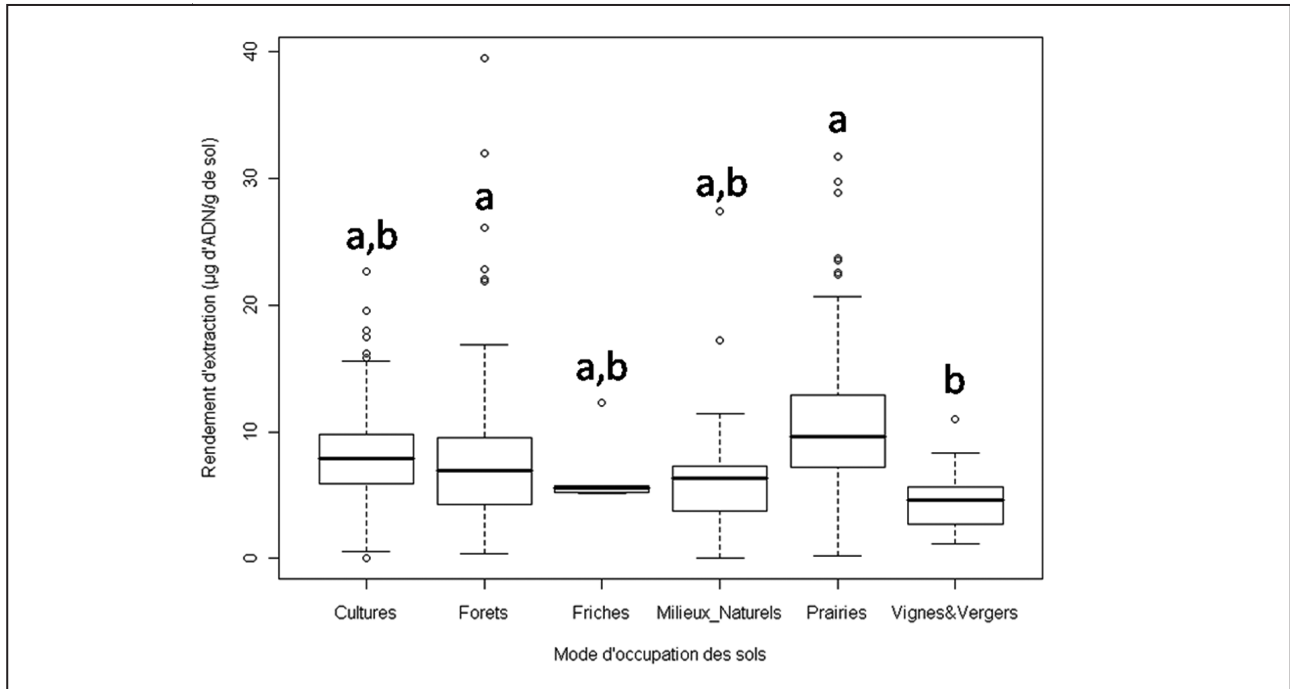


Figure 5: Relation entre le rendement d'extraction et le mode d'occupation des sols (répartition des situations : 494 cultures - 20 vignes et vergers - 87 forêts - 5 friches - 13 milieux naturels - 233 prairies).

Figure 5: Relationship between DNA yield and land use (494 crop systems - 20 vineyards and orchards - 87 forests - 5 wild lands - 13 natural environments - 233 grasslands).



deux à deux de Wilcoxon (au seuil de 5 % ; groupes notés a, b et c sur la figure 5) mettent en avant que les sols sous vignes ou vergers présentent statistiquement moins d'ADN que la plupart des autres situations. Le mode de gestion prairies présente quant à lui le rendement d'extraction le plus fort. Ces résultats sont cependant préliminaires et sont à mettre en regard au faible nombre données disponibles notamment dans les situations en vignes et en vergers. L'analyse sur la totalité du réseau de prélèvements permettra d'affiner les conclusions et d'établir les déterminismes expliquant les variations.

Ces premiers résultats révèlent donc que le rendement d'extraction est fortement corrélé aux caractéristiques physico-chimiques mais aussi au mode d'occupation des sols, paramètres qui structurent fortement la quantité de biomasse. Ces constats vont dans le sens de travaux précédents qui démontraient que ce rendement d'extraction se révèle être un bon estimateur de la quantité de biomasse (Widmer *et al.*, 2006; Marstorp *et al.*, 2000; Hartman *et al.*, 2006; Leckie *et al.*, 2004).

Figure 6: Carte de la zone d'étude des structures génétiques des communautés bactériennes.

Figure 6: Zone of study of the bacterial communities genetic structures.

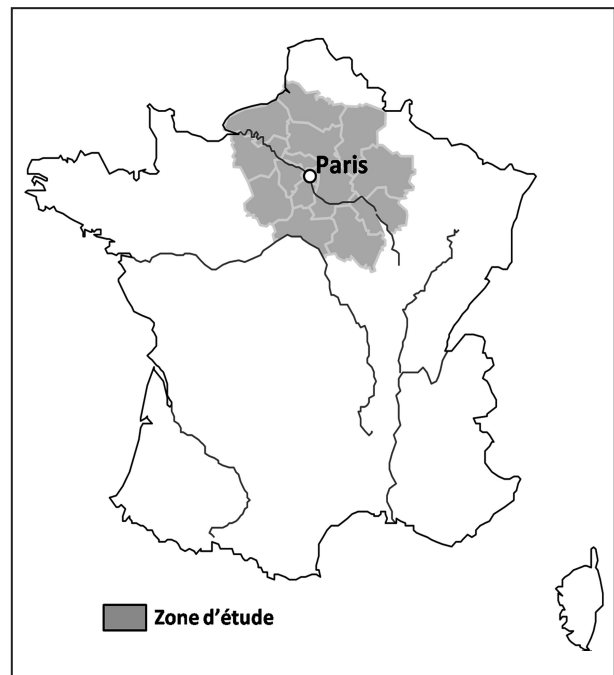
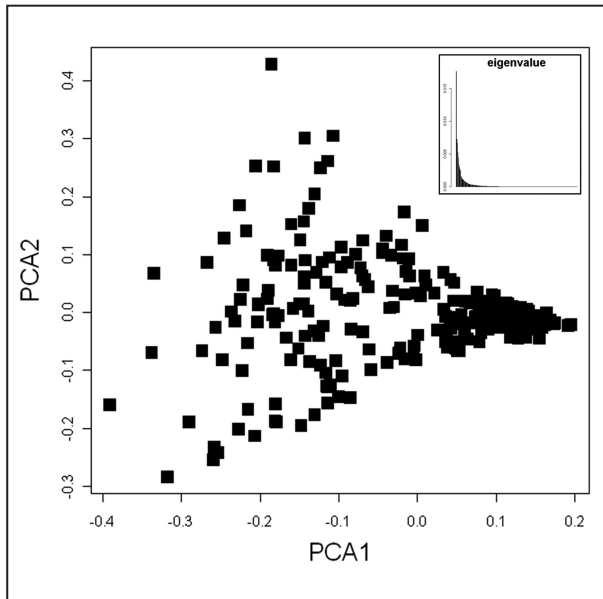


Figure 7: Plan factoriel (ACP) des structures génétiques des communautés bactériennes (291 échantillons; axes 1 [24,3 %] et 2 [10,0 %]).

Figure 7: Factorial map (PCA) of the bacterial communities genetic structures (291 samples; axis 1 [24,3 %] and 2 [10,0 %]).



Structure génétique des communautés bactériennes

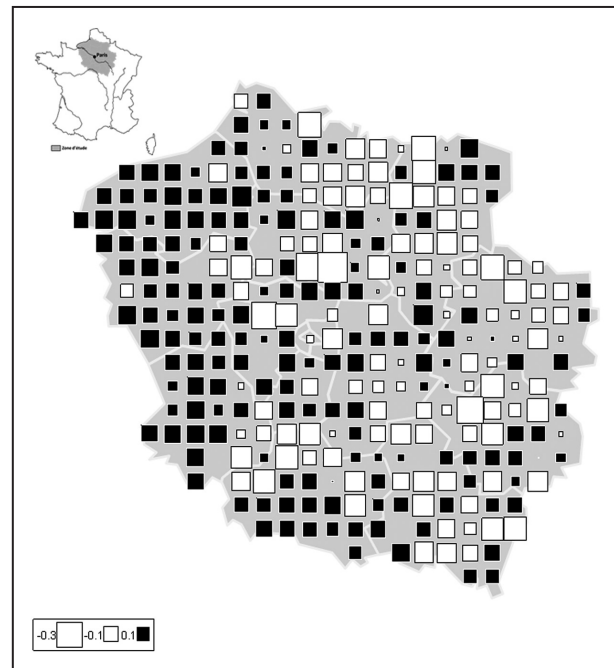
Le présent article fait état des résultats obtenus pour le programme ECOMIC-RMQS dans le cadre du financement ADEME. L'effort fait pour l'acquisition des profils B-ARISA de structure génétique des communautés bactériennes s'est focalisé sur une zone incluant Paris. L'objectif étant d'obtenir, dans un premier temps, un jeu de données contiguës suffisant permettant d'aborder une représentation spatiale et de développer les outils statistiques associés. Deux cent quatre-vingt-onze profils génétiques de communautés bactériennes de sols situés dans le bassin parisien ont été obtenus (*figure 6*).

Le plan factoriel de l'analyse en composante principale des profils B-ARISA des communautés bactériennes montre une bonne discrimination des sites sur l'ensemble du plan représentatif des composantes 1 et 2 (*figure 7*). Ceci traduit une forte variabilité structurale de ces communautés bactériennes sur les sites étudiés.

Une première approche pour aborder la distribution spatiale des structures des communautés bactériennes consiste à projeter, sur la carte de la zone, la coordonnée, sur le premier axe du plan factoriel, de chacun des sites. Cette méthode permet de définir les structures géographiques de distribution de cette structure.

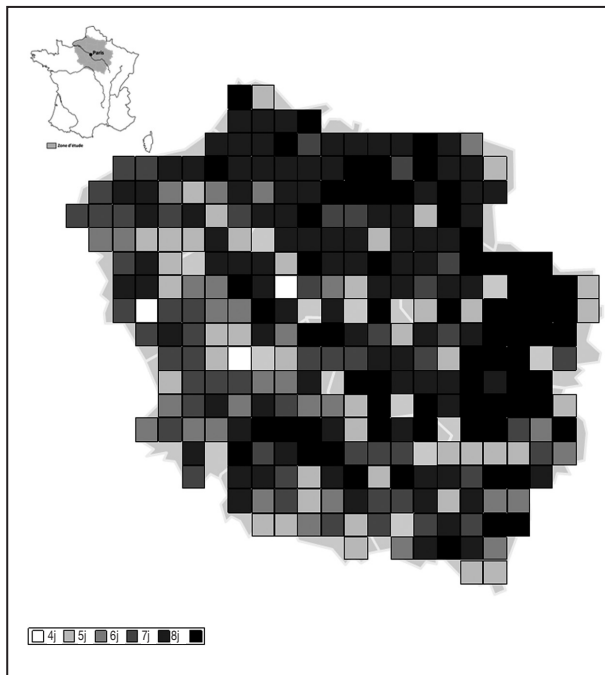
Figure 8: Cartographie de la diversité génétique des communautés bactériennes de la zone d'étude (coordonnées sur le premier axe de l'ACP). Chaque carré représente la structure génétique de la communauté bactérienne du sol. La taille et la couleur des carrés représentent les différences de structures génétiques de ces communautés entre les sites.

Figure 8: Map of the bacterial communities genetic diversity in the zone of study (score on the first PCA eigenvalue). Each square represents the genetic structure of bacterial community of the soil. Size and color of squares represent differences of bacterial communities genetic structure between sites.



La carte de représentation des similarités de structure génétique (*figure 8*) met en évidence le caractère non aléatoire de la répartition de ces structures de communautés bactériennes dans l'espace. En effet, nous pouvons observer des zones présentant des structures génétiques proches représentées par un ensemble de carrés noirs contigus par exemple. A l'inverse, des zones s'opposent d'un point de vue des structures génétiques des communautés bactériennes qui les composent puisqu'elles apparaissent sous la forme de carrés blancs contigus.

L'observation de la répartition des profils géographiques de distribution des structures génétiques des communautés semble démontrer que les micro-organismes, contrairement à certains macro-organismes, sont peu ou pas influencés par les paramètres géographiques. Le positionnement relatif (latitude et longitude) n'influence pas les motifs de distribution spatiale des micro-organismes puisque nous n'observons pas de gradient nord/sud ou est/ouest des structures de communautés bactériennes. Les travaux de Fierer et Jackson (2006) sur un

Figure 9: Carte du pH sur la zone d'étude.**Figure 9:** Map of pH in the zone of study.

transect Nord/Sud du continent américain dans son intégralité (98 échantillons au total depuis l'Alaska jusque la Terre de Feu) font état de l'absence d'influence du climat ou du positionnement géographique sur la richesse et la diversité des communautés microbiennes. Cette étude révèle que le pH s'avère être le meilleur prédicteur des paramètres microbiens étudiés. Madigan *et al.* (1997) mentionnent que le pH intracellulaire de la majorité des bactéries se situe généralement à moins d'une unité pH de la neutralité. La variation du pH de l'environnement (pH extracellulaire) dans les sols s'apparente donc à un stress pour les organismes microbiens, ce qui conforte les résultats de Fierer et Jackson. Par analogie, la *figure 9* représente la variation de pH dans la zone définie dans notre étude. La confrontation de la distribution spatiale des variations de pH avec la répartition des structures génétiques des communautés bactériennes révèle des structures spatiales comparables. Les sols présentant un sol à pH basique ont une structure-bactérienne similaire qui s'oppose à celles des sols à pH acides. Des travaux réalisés en milieu aquatique (Fierer *et al.*, 2007; Van der Gucht *et al.*, 2007) arrivent aux mêmes conclusions quant à l'influence supérieure des paramètres locaux (caractéristiques du milieu environnant) sur les paramètres environnementaux globaux (climat, positionnement géographique) et notamment l'impact fort du pH.

CONCLUSION

Ces premiers résultats sont très prometteurs, ils confirment l'intérêt d'appréhender l'écologie des micro-organismes à une échelle qui dépasse celle du paysage. Ils mettent en avant également la possibilité d'augmenter la généralité des conclusions par l'application des outils d'écologie moléculaire microbienne à un échantillonnage de cette ampleur. Ces résultats restent cependant à confirmer avec la totalité des sites du RMQS, en confrontation avec l'ensemble des données environnementales mesurées dans le cadre du réseau de surveillance sol (caractéristiques physico-chimiques, enquêtes sur les pratiques agricoles, données climatiques...) et en appliquant des outils statistiques plus poussés, notamment en terme d'analyse spatiale (géostatistiques, auto-corrélation spatiale).

PERSPECTIVES

Les perspectives à un programme de cette ampleur sont multiples.

Dans le cadre du projet RMQS du GIS Sol et son interaction avec l'Unité Mixte de Recherche en Microbiologie du Sol et de l'Environnement, il s'agira dans un premier temps de finaliser l'acquisition des données biologiques et abiotiques et de confronter la totalité de ces données. Le lien entre diversité végétale et diversité microbienne associée pourra être abordé grâce aux relevés floristiques réalisés dans le cadre du réseau de surveillance des sols sur les sites prairiaux, forestiers et naturels notamment.

Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols constitue, de par son approche spatiale, un outil permettant de faire le bilan de la qualité des sols en France et également de caractériser des gradients de contamination diffuse. Mais il se veut aussi un outil de détection des évolutions en renouvelant les campagnes de prélèvements avec un pas de temps avoisinant les 10 ans. Dans ce contexte, l'évolution de la vie microbienne sera également suivie afin d'identifier ses modifications en lien avec les modifications des caractéristiques abiotiques du milieu et notamment les altérations du climat dans un contexte de changements globaux.

L'approche moléculaire basée sur la technique d'empreinte ARISA permet une première évaluation, le développement de concept et l'identification des structures spatiales de distribution géographiques de la diversité microbienne. Elle reste cependant une approche descriptive de la structuration de la communauté microbienne dans son ensemble sans offrir la possibilité d'atteindre l'information taxonomique et donc l'établissement de réels indices de diversité. Pour cela, un projet nommé Taxomic-RMQS est en cours d'élaboration pour permettre, par l'utilisation de techniques de séquençage massif (pyroséquençage) des gènes taxonomiques, d'accéder à la biodiversité microbienne (richesse spécifique) de la totalité des sols du RMQS. Cette mesure de biodiversité pourra être confrontée aux caractéristiques

abiotiques du RMQS et aux différentes pressions anthropiques définies. Le projet permettra également de traduire cette diversité en termes de fonctionnement biologique des sols.

Afin d'augmenter encore la généralité des conclusions obtenues, il s'agira également d'envisager d'augmenter la surface d'investigation afin de multiplier les situations et contrastes pédo-climatiques mais aussi la diversité des activités anthropiques rencontrées. Un consortium scientifique européen est actuellement en train de se monter afin d'évaluer la faisabilité d'un tel projet (Gardi *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAPHIE

- Arrouays D., Jolivet C., Boulonne L., Bodineau G., Ratié C., Saby N., Grolleau E., 2003 - Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS) de France. Etude et Gestion des Sols. Vol 10, 4: pp 241-250.
- Bressan M., Mougél C., Dequiedt S., Maron P.A., Lemanceau P., Ranjard L., 2008 - Response of Soil Bacterial Community Structure to Successive Perturbations of Different Types and Intensities. *Environmental Microbiology*, 10: pp 2184-2187.
- Bru D., Sarr A., Philippot L., 2007 - Relative abundances of proteobacteria membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl Environ. Microbiol.* 73: pp 5971-5974.
- Bivand R., Anselin L., Assunção R., Berke O., Bernat A., Carvalho M., Chun Y., Dormann C., Dray S., Halbersma R., Krainski E., Lewin-Koh N., Li H., Ma J., Millo G., Mueller W., Ono H., Peres-Neto P., Reder M., Tiefelsdorf M. and Yu D., 2008 - spdep: Spatial dependence: weighting schemes, statistics and models. R package version 0.4-29. In <http://cran.at.r-project.org/web/packages/spdep>.
- Dechesne A., Pallud C., Debouzie D., Flandrois JP., Vogel TM. Gauder JP., Grundmann GL., 2003 - A novel method for characterizing the microscale 3D spatial distribution of bacteria in soil. *Soil Biol Biochem.* 35: pp 1537-1546.
- Dolfing J., Vos A., Bloem J., Ehlert P.A.I., Naumova N.B., Kuikman P.J., 2004. Microbial diversity in archived soils. *Science*. Vol 306: p 812.
- Dray S., Chessel D., Thioulouse J., 2003 - Co-inertia analysis and the linking of ecological data tables. *Ecology* 84: pp 3078-3089.
- Felske A., Akkerman A.D.L., 1998 - Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. *Microbial Ecology* 36: pp 31-36.
- Fierer N., Jackson R. B., 2006 - The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 103: pp 626-631.
- Fierer N., Morse J.L., Berthrong S.T., Bernhardt E.S., Jackson R.B., 2007 - Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology*, 88: pp 2162-2173.
- Foster R.C., 1988 - Microenvironments of soil microorganisms. *Biol Fertil Soil* 6: pp 189-203.
- Frostegard A., Courtois S., Ramière V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., and Simonet P., 1999 - Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl Environ Microbiol* 65: pp 5409-5420.
- Gardi C., Montanarella L., Arrouays D., Bispo A., Lemanceau P., Jolivet C., Mulder C., Ranjard L., Rombke L., Rutgers M., Menta C., 2009 - Soil Biodiversity monitoring in Europe: ongoing activities and challenges. *European Journal of Soil Science*. 60:807-819.
- Green J.L., Holmes A.J., Westoby M., Oliver I., Briscoe D., Dangerfield M., Gillings M., Beattie A.J., 2004 - Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*. 432: pp 747-750.
- Hartman M., Fliessbach A., Oberholzer H.R., Widmer F., 2006 - Ranking the magnitude of crop and farming system effects on soil microbial biomass and genetic structure of bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 57: pp 378-388.
- Hattori T. and Hattori R., 1976 - The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *CRC Critical Rev Microbiol.* 16: pp 423-460.
- Heymann Y., Steenmans C., Croisille G., Bossard M., 1994 - Corine Land Cover: Technical Guide Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg.
- Horner-Devine M.C., Lage M., Hughes J.B., Bohannon B.J.M., 2004 - A taxon-area relationship for bacteria. *Nature*. 432: pp 750-753.
- Jessup C.M., Kassen R., Forde S.E., Kerr B., Buckling A., Rainey P.B., Bohannon B.J.M., 2004 - Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in Ecology and Evolution*. 19: pp 189-197.
- Jolivet C., Arrouays D., Boulonne L., Ratié C., Saby N., 2006 - Le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols de France (RMQS), Etat d'avancement et premiers résultats. *Etude et Gestion des Sols*. Vol 13, 3: pp 149-164.
- Kuske C. R., Banton K. L., Adorada D. L., Stark P. C. Hill, K. K. and Jackson P. J., 1998 - Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environ Microbiol* 64: pp 2463-2472.
- Leckie S.E., Prescott C.E., Grayston S.J., Neufeld J.D., Mohn W.W., 2004 - Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol Biochem.* 36: pp 529-532.
- Madigan M., Martinko J., Parker J., 1997 - Brock Biology of Microorganisms. (Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ).
- Marstorp H., Guan X., Gong P., 2000 - Relationship between dsDNA, chloroform labile C and ergosterol in soils of different organic matter contents and pH. *Soil Biol Biochem.* 32-6: pp 879-882.
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J. C., Soulas G., and Catroux G.; 2001 - DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: pp 2354-2359.
- Martiny J.B.H., Bohannon B.J.M., Brown J.H., Colwell R.K., Furhman J.A., Green J.L., Horner-Devine M.C., Kane M., Krumsin J.A., Kuske C.R., Morin P.J., Naeem S., Ovreas L., Reysenbach A.L., Smith V.H., Staley J.T., 2006 - Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature* 4: pp 102-112.
- Morvan X.P.P., Saby N.P.A., Arrouays D., Le Bas C., Jones R.J.A., Verheijen F.G.A., Bellamy P.H., Stephens M., Kibblewhite M.G., 2008 - Soil monitoring in Europe: a review of existing systems and requirements for harmonisation. *Sci. Tot. Env* 391: pp 1-12.
- R Development Core Team, 2008 - R: A Language and Environment for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
- Ranjard L., Richaume A., Jocteur Monrozier L., Nazaret S., 1997 - Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology*. 24: pp 321-331.
- Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Nazaret S., 1998 - A single procedure to recover DNA from the surface or inside aggregates and in various size fractions of soil suitable for PCR-based assays of bacterial communities. *European Journal of Soil Biology*. 34: pp 89-97.
- Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Gourbière F., Thioulouse J., Nazaret S., 2000a - Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprint approach (RISA). *Microbial Ecology*. 39: pp 263-272.
- Ranjard L., Poly F., Nazaret S., 2000b - Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*. 151: pp 167-177.

- Ranjard L., Richaume AS., 2001 - Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152-8: pp 707-716.
- Ranjard L., Lejon D., Mougél C., Scherer L., Merdinoglu D., Chaussod R.; 2003- Sampling Strategy in Molecular Microbial Ecology: Influence of Soil Sample Size on DNA Fingerprinting Analysis of Fungal and Bacterial communities. *Environmental Microbiology*. 5: pp 1111-1120.
- Ranjard L., Dequiedt S., Lelievre M., Maron PA., Mougél C., Morin F., Lemanceau P., 2009 - Platform GenoSol: a new tool for conserving and exploring soil microbial diversity. *Environmental Microbiology report*. 1: pp 97-99.
- Swift M.J., 1999 - Towards the second paradigm: integrated biological management of soil. In: *Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas*. pp.11-24. UFLA, Lavras, Brasil.
- Thioulouse J. et al. 1997 - ADE-4: A multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*. 7: pp 75-83.
- Torsvik V., Ovreas L., Thingstad T.F., 2002 - Prokaryotic diversity-Magnitude, dynamics and controlling factors. *Environ. Microbiol.* 296: pp 1064-1066.
- Van des Gucht K., Cottenie K., Muylaert K., Vloemans N., Cousin S., Declerck S., Jeppesen E., Conde-Porcuna J.M., Schwenk K., Zwart G., Degans H., Vyverman W., De Meester L., 2007 - The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 104: pp 20404-20409.
- Widmer F., Rasche F., Hartmann M., Fliessbach A., 2006 - Community structure and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long term field experiment. *Appl Soil Ecol.* 33: pp 294-307.
- Zhou J., Bruns M., and Tiedje J., 1996 - DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 62: pp 316-322.

