

Introduction : L'étude des flux de carbone issus de la biomasse microbienne des sols est un enjeu majeur de ces prochaines années car elle est très affectée par le réchauffement climatique [1]. La mesure isotopique en d^{18}O de l'ADN du sol incubé avec de l'eau lourde est utilisée comme indicateur de la croissance microbienne dans le sol [2]. L'objectif de cette note technique est donc de décrire la méthodologie utilisée pour détecter et quantifier cet ADN grâce à un pyrolyseur couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (Pyr-IRMS).

Matériel et Méthodes : L'extraction (kit Qiagen DNeasy Powersoil Pro) et le dosage de l'ADN ont été effectués au Centre britannique d'Ecologie et d'Hydrologie de Wallingford. Les échantillons ont été stabilisés dans un tampon TRIS (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) et envoyés à la plateforme Silvatech pour analyses isotopiques. Huit échantillons ont été testés, quatre sont des témoins (non marqués) et quatre sont des échantillons avec marquage (^{18}O) (Tableau1) [3].

Au sein de Silvatech, une solution à 10mg/mL d'ADN de sperme de saumon (*Sigma 31149 Lot BCCF4033*) diluée dans de l'eau MilliQ a été réalisée (échantillon réf.). Cette solution nécessite une agitation pendant une nuit afin de permettre la dissolution de l'ADN dans l'eau ultra pure. Puis, 10 μL de cette solution ont été déposés dans 9 capsules en argent (*Elemental microanalysis (c), D2000*) et séchés à l'étuve pendant 2h à 60°C. Une fois le liquide évaporé, nous avons ajouté les échantillons (1 à 8) dans les capsules en argent en ajustant le volume prélevé afin d'obtenir 2 μg d'ADN microbien dans chaque capsule. L'étape de séchage est répétée pour conserver un extrait sec. Il est important de noter que le Tampon Tris-Cl ne s'évapore pas à 60°C.

Chaque échantillon est analysé en Pyr-IRMS (*Pyrocube & Isoprime, Elementar*®), la température de pyrolyse est fixée à 1450°C, ce qui permet de décomposer les échantillons en gaz élémentaire ($\text{H}_2, \text{CO}, \dots$). Le gaz H_2 ne va pas être retenu dans le pyrolyseur alors que le CO sera piégé à température ambiante sur une colonne d'adsorption (*Elementar*® GmbH) avant d'être libéré à 150°C. Enfin, des gaz de références ultrapurs de H_2 et de CO sont introduits de manière à ne pas éluer en même temps que les pics échantillon afin d'obtenir le $\delta^2\text{H}$ et le $\delta^{18}\text{O}$ sur une seule analyse. L'IRMS est réglé à 400 de courant de trap pour les deux rapports isotopiques. Ce courant permet d'augmenter la sensibilité de l'instrument. Il est classiquement compris entre 50uA et 800uA. L'échantillon réf. composé d'ADN de saumon du commerce a été mesuré à 17,4 % en d^{18}O .

Conclusion : Nous pouvons réaliser l'analyse de l'ADN de sol en $\delta^{18}\text{O}$ au sein de la plateforme Silvatech. A protocole d'extraction d'ADN équivalent, nous pourrions même diminuer fortement le rapport 50:1 entre l'ADN de saumon et l'ADN microbien afin de mettre en évidence une différence isotopique encore plus importante concernant les échantillons marqués. Il peut être intéressant de vérifier la contribution isotopique du tampon TRIS seul afin d'évaluer si sa contribution isotopique est négligeable.

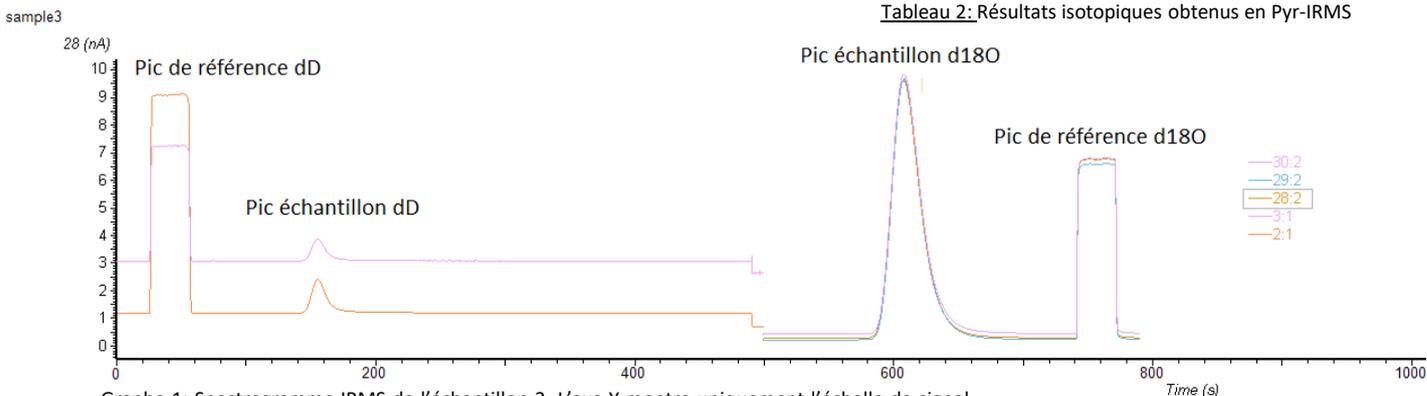
Echantillon	Marquage au ^{18}O	Concentration d'ADN (ng/ul)	Volume (ul)
1	oui	113	~80
2	oui	98	~80
3	non	111	~80
4	non	67	~80
5	oui	69	~80
6	oui	73	~80
7	non	73	~80
8	non	85	~80

Tableau 1: Caractéristiques des échantillons d'ADN tests

Résultats : Le graphe 1 illustre l'acquisition en IRMS de l'échantillon 3. On peut donc voir que le mélange d'ADN de saumon et d'ADN microbien peuvent être détecté et quantifié, la zone de quantification de l'IRMS étant comprise entre 1 et 16 nA pour l'isotopologue majoritaire. Le Tableau 2 résume également les résultats obtenus en $\delta^{18}\text{O}$. Pour les échantillons non marqués (3,4,7,8), une différence de moins de deux pour mille entre la signature isotopique de l'échantillon et celle de l'ADN de saumon du commerce est mesurée (échantillon réf). Sachant que l'incertitude globale combinée est de 0,5‰. En revanche pour les échantillons marqués en ^{18}O on peut voir que la signature isotopique est bien différente de celle l'ADN de saumon (>15‰). On peut donc calculer la signature originale en pondérant la contribution de la signature isotopique de l'ADN de saumon (17,4 ‰) qui est de 50 pour 1 par rapport à l'ADN marqué en supposant que l'apport de la signature TRIS est négligeable (Tableau 2).

Echantillon	Signal (nA)	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	Différence de signature isotopique entre l'ADN de saumon et l'échantillon (‰)	Signature d'origine de l'ADN (‰)
1	9,2	33,2	15,9	793
2	13,2	55,4	38,1	1903
3	9,3	17,4	0,0	0
4	12,2	18,4	1,0	50
5	14,0	38,6	21,2	1061
6	14,4	46,6	29,2	1461
7	13,6	19,2	1,8	89
8	11,7	18,7	1,3	65
réf.	9,0	17,4	0,0	

Tableau 2: Résultats isotopiques obtenus en Pyr-IRMS



Graph 1: Spectrogramme IRMS de l'échantillon 3. L'axe Y montre uniquement l'échelle de signal (nA) de la masse majeure 28 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}$), l'axe X représente le temps (s)

Références :

- [1] Walker, T. W. N. et al. Microbial temperature sensitivity and biomass change explain soil carbon loss with warming. *Nat. Clim. Change* **8**, 885–889 (2018).
- [2] Blazewicz, S.J., Schwartz, E. Dynamics of ^{18}O Incorporation from H_2^{18}O into Soil Microbial DNA. *Microb Ecol* **61**, 911–916 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9826-7>
- [3] Spohn et al. Microbial carbon use efficiency and biomass turnover times depending on soil depth - implications for carbon cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 96 (2016), pp. 74-81