

Approches moléculaires proposées pour caractériser les fonctions écologiques microbiennes du sol dans le cadre d'une réhabilitation écologique



**APPROCHES MOLECULAIRES PROPOSEES POUR
CARACTERISER LES FONCTIONS ECOLOGIQUES
MICROBIENNES DU SOL DANS LE CADRE D'UNE
REHABILITATION ECOLOGIQUE**

ANNEXE 4 DE L'ETUDE :

**OUTIL DE CONCEPTION ET DE SUIVI DE LA REHABILITATION ECOLOGIQUE
DE SITES DEGRADEES INTEGRANT LES SOLUTIONS FONDEES SUR LA NATURE
EXEMPLES D'APPLICATION EN CONTEXTE URBAIN**

RAPPORT FINAL

juin 2021

F. BAPTIST, S. COTILLON – Biotope
J. HELLAL, E. LIMASSET – BRGM
C. ANGLADA, S. BENZEKRI – Vertigo Lab



Créée à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD est depuis 1989, le catalyseur d'une coopération entre industriels, institutionnels et chercheurs.

Acteur reconnu de la recherche appliquée dans le domaine des déchets, des sols pollués et de l'utilisation efficace des ressources, RECORD a comme objectif principal le financement et la réalisation d'études et de recherches dans une perspective d'économie circulaire.

Les membres de ce réseau (groupes industriels et institutionnels) définissent collégialement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

Avertissement :

Les rapports ont été établis au vu des données scientifiques et techniques et d'un cadre réglementaire et normatif en vigueur à la date de l'édition des documents.

Ces documents comprennent des propositions ou des recommandations qui n'engagent que leurs auteurs. Sauf mention contraire, ils n'ont pas vocation à représenter l'avis des membres de RECORD.

- ✓ Pour toute reprise d'informations contenues dans ce document, l'utilisateur aura l'obligation de citer le rapport sous la référence :

RECORD, Outil de conception et de suivi de la réhabilitation écologique de sites dégradés intégrant les solutions fondées sur la nature. Exemples d'application en contexte urbain, 2021, 111 p, n°19-1024/1A

- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de la transition écologique)
www.ademe.fr

Comité de suivi de l'étude :

Catherine BAUMGARTNER - EDF, Bénédicte COUFFIGNAL - RECORD, Caroline de ZUTTER - ENGIE, Isabelle DEPORTES - ADEME, Nadia DJEMEL - TOTAL / RETIA, Cécile GRAND - ADEME, Nathalie GUISERIX - RENAULT, Jean-Philippe JAEG - RECORD / Ecole vétérinaire de Toulouse, Roger JACQUET - SOLVAY, Fabien LAURENT - SOLVAY, Loic PIANFETTI - SNCF, Lilian MARCHAND - Le Lyre – Suez eau France, Inès IMBERT - EIFER

© RECORD, 2021

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
ORIGINE ET CONCEPT DES APPROCHES MOLECULAIRES.....	4
METHODES BASEES SUR L'ADN ET L'ARN (GENOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE)	5
FOCUS SUR LES TECHNIQUES PROPOSEES DANS L'ETUDE RECORD	6
AUTRES TECHNOLOGIES OMIQUES : LES OUTILS DE DEMAIN ?	8
QUELLE APPLICATION DE CES APPROCHES DANS LE CADRE D'UNE REHABILITATION ECOLOGIQUE ?	9
CONCLUSION : LES ENJEUX DE DEMAIN	9
REFERENCES	10

Introduction

Dans le cadre des travaux du projet RECORD sur l'évaluation du succès des opérations de réhabilitation écologique et de dépollution des habitats dégradés en contexte urbain, un outil de suivi opérationnel destiné aux gestionnaires et industriels a été proposé. Une des matrices établie dans cette étude identifie les fonctions et processus écologiques réalisés par les sols, les indicateurs de ces processus ainsi que les outils de mesure disponibles pour les évaluer. Parmi ces outils sont proposés la quantification de la biomasse moléculaire des sols, l'évaluation de la diversité microbienne par séquençage d'ADN microbien et la mesure de l'abondance de gènes impliqués dans des activités spécifiques.

L'objectif de cette note est de présenter plus en détail les approches moléculaires de mesure de la diversité génétique et fonctionnelle des communautés microbiennes qui sont aujourd'hui à différents niveaux d'opérationnalité.

Remarque : Cette note présente uniquement les approches moléculaires utilisées pour cibler les communautés microbiennes du sol et non les approches appliquées aux organismes supérieurs et basées sur l'ADNe. L'analyse d'ADN environnemental ou ADNe consiste à récupérer dans une matrice environnementale (eau, sol) les traces d'ADN laissées par les organismes vivants (Taberlet et al., 2018). En effet tous les organismes vivants laissent des traces d'ADN, témoin de leur passage et libéré par la peau, les mucus, les fèces, l'urine... dans un mélange complexe d'ADNe nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique, se trouvant sous forme intracellulaire (contenu dans des cellules vivantes) ou extracellulaire. Selon les conditions du milieu (température, humidité...), cet ADNe sera conservé plus ou moins longtemps dans l'environnement. En bref, les techniques d'analyse pour étudier ces ADNe sont les mêmes que pour les communautés microbiennes (PCR, séquençage) mais ciblent d'autres marqueurs génétiques. La démocratisation des méthodes de séquençage permet aujourd'hui d'approfondir les connaissances sur l'ADNe, de développer et standardiser les méthodes et de caler les données avec des méthodes d'échantillonnage plus traditionnelles. Bien que son utilisation dans le monitoring tend à se développer dans les sols, il reste encore des verrous scientifiques qui requièrent aujourd'hui davantage de données empiriques afin de standardiser la méthodologie d'échantillonnage notamment (Garlapati et al. 2019, Ruppert et al., 2019).

Origine et concept des approches moléculaires

Dans les sols ont lieu de nombreuses fonctions écologiques qui contribuent au bon fonctionnement des écosystèmes et à la provision de services au bénéfice de l'homme et de son environnement. Les microorganismes hébergés par le sol y jouent des rôles clés parmi lesquels le recyclage de la matière organique, la fourniture de nutriments aux plants, le maintien de la structure du sol, ou encore une source de nourriture pour d'autres organismes de la chaîne trophique. L'hétérogénéité du sol et la variation des réactions qui s'y produisent font que les sols hébergent une forte diversité de microorganismes (bactéries et archées, champignons, virus, algues). Cette diversité et l'activité du compartiment microbien du sol sont fortement dépendantes de la composante abiotique des sols (pH, humidité, teneur en C, N, présence de polluants...). Ainsi une bonne compréhension de l'état et du fonctionnement des sols nécessite de savoir qui est présent, pour quelles fonctions, mais aussi comment les microorganismes interagissent avec leur environnement (Biswas et Sarkar 2018).

Pour acquérir ces connaissances, les microbiologistes ont longtemps été limités à des approches dites « culturelles » pour étudier les activités et la diversité microbiologique des sols alors qu'on considère que seuls 1 % des bactéries du sol sont cultivables. L'avènement de méthodes s'affranchissant de la nécessité des cultures pour étudier les communautés microbiennes des sols avec notamment la découverte de l'ADN et de l'amplification de gènes par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) et le développement des méthodes moléculaires à partir des années 80 ont permis de commencer à ouvrir la boîte noire que représentait la diversité microbienne des sols. A partir des années 2000, ces avancées se sont poursuivies avec le développement puis la démocratisation de méthodes de séquençage dites de prochaine génération (NGS : next generation sequencing), en particulier, la métagénomique ciblée ou metabarcoding qui fait référence à l'étude des séquences d'un gène connu et amplifié.

Le terme de métagénomique a été proposé en 1998 par Handelsman et al., pour désigner l'étude de multiples génomes dans un environnement spécifique, alors que la génomique fait référence à une analyse appliquée à un seul organisme. Le terme « **omique** » est la quantification ou caractérisation de molécules d'origine biologique pour détecter les fonctions, la structure, la physiologie et les

mécanismes moléculaires d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes (Feng, 2013). Ce terme regroupe alors les différentes approches permettant de caractériser la diversité génétique et fonctionnelle des microorganismes dans leur ensemble sans *a priori* et par l'analyse en haut débit des **ADN** (métagénomique), **ARN** (métatranscriptomique), **protéines** (méta-protéomique) ou des **métabolites** (métabolomique) (Bouchez et al. 2017) (Figure 1). **L'ADN** est la molécule ciblée en génomique environnementale et son étude permet d'accéder à la densité et à la diversité des communautés microbiennes, **l'ARN** reflète l'ADN transcrit et permet d'accéder à la quantification et l'identification de populations ou métabolismes actifs dans un environnement donné. La protéomique cible les **protéines** synthétisées à partir des ARN par les communautés microbiennes et permet d'accéder à la fonctionnalité à travers l'étude des enzymes produits et réellement responsables d'une activité dans un environnement donné. Enfin, l'étude des **métabolites** synthétisés par les communautés microbiennes permet l'identification de produits finaux ou intermédiaires de leur activité.

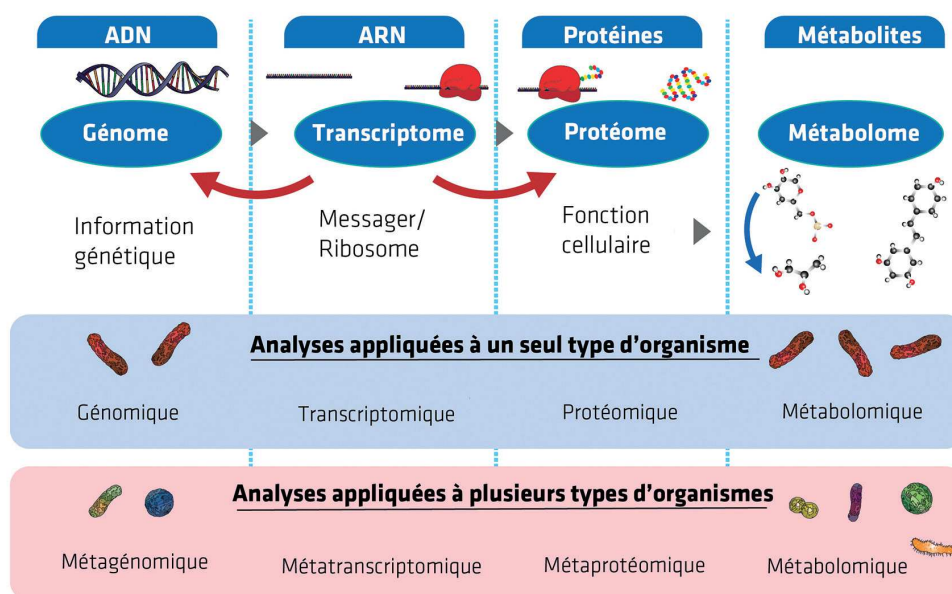


Figure 1. Différents niveaux d'intégration des techniques de microbiologie moléculaire (ADEME®, schéma issue de l'ouvrage Bouchez et al., 2017).

Méthodes basées sur l'ADN et l'ARN (génomique et transcriptomique)

A l'exception de la méthode FISH, toutes ces approches sont basées d'abord sur l'extraction de l'ADN ou des ARN de l'échantillon environnemental. La concentration en ADN extrait est une mesure de biomasse appelée « biomasse moléculaire » qui est également un indicateur biologique. Le tableau ci-dessous présente succinctement les techniques les plus courantes pour l'étude de l'ADN et l'ARN microbien dans l'environnement.

Tableau 1. Présentation des différentes méthodes d'analyses.

Analyse	Méthode	Définition
Détection/abondance de microorganismes ou de fonctions	PCR quantitative	Quantification de l'abondance d'un gène ciblé (spécifique à une activité donnée ou pour évaluer l'abondance d'une communauté microbienne dans un échantillon).
	FISH (Hybridation Fluorescente In Situ)	Hybridation de sondes ADN couplées à un fluorochrome sur l'ADN de cellules microbiennes ce qui permet leur identification et dénombrement visuel par observation au microscope à fluorescence ou confocal.
Diversité génétique/fonctionnelle de la communauté microbienne	Capture de gènes	Capture d'un gène ciblé par hybridation préalablement au séquençage, permettant d'éviter les biais liés à la PCR. Pour plus d'information voir Denonfoux et al.

Analyse	Méthode	Définition
		(2013).
	Puce à ADN	Fixation de sondes (petites séquences d'ADN) sur une base solide pour y hybrider les gènes complémentaires de ces séquences d'ADN et contenus dans un échantillon. Cette approche permet d'étudier simultanément tous les gènes d'un organisme et d'identifier plusieurs milliers de gènes dans un environnement. Pour plus d'information voir Dugat-Bony et al. (2012).
	Séquençage d'amplicons ciblés	Séquençage d'un fragment d'ADN préalablement amplifié par PCR : soit un gène universel, par ex. le gène codant l'ARNr 16S pour les bactéries ou celui codant l'ARNr 18S pour les champignons, permettant une identification de la diversité de la communauté dans son ensemble, soit d'un gène spécifique d'une population ou fonction spécifique. Pour plus d'information voir Terrat et al. (2015)
	Séquençage d'ADN global (Shotgun)	Séquençage sans <i>a priori</i> des ADN d'un échantillon, permettant d'identifier l'ensemble des gènes d'une communauté et la reconstruction de génomes et de cycles biogéochimiques dans un environnement donné – accès aux fonctions portées par la communauté ainsi qu'à sa diversité.
Structure génétique de la communauté microbienne	Analyses électrophorétiques (empreintes moléculaires: DGGE, CE-SSCP, T-RFLP, ARISA)	Visualisation sur gel ou profils capillaires de la structure des communautés microbiennes – peut également cibler le gène codant l'ARNr 16S, 18S ou un autre gène (fonctionnel) connu. Pour plus d'information voir Ranjard et al. (2000).

Focus sur les techniques proposées dans l'étude RECORD

Les indicateurs utilisant des méthodes moléculaires proposés dans le cadre de RECORD sont basés sur des analyses d'ADN du sol, soit dans un contexte d'évaluation de la diversité (fonction habitat pour la diversité) soit pour évaluer un potentiel de dégradation ou de transformation de nutriments ou de polluants (fonction rétention et fourniture des nutriments pour les organismes du sol et les végétaux et fonction de rétention et dégradation des polluants). En conséquence, les techniques proposées sont basées sur l'extraction et la quantification des ADN du sol (biomasse moléculaire), l'amplification de gènes ciblés par PCR ou qPCR (PCR quantitative) ainsi que le séquençage d'amplicons (gènes ciblés amplifiés). Bien que d'autres méthodes existent (voir paragraphe précédent), ces techniques sont les plus accessibles et les plus utilisées aujourd'hui dans un contexte de monitoring des sols.

Biomasse moléculaire (ADN extrait)

A la base de nombreuses techniques de microbiologie moléculaire, l'extraction d'ADN représente généralement l'une des premières étapes dans l'étude des communautés microbiennes du sol. Pour y parvenir une norme a été développée (ISO 11063, 2012) mais il existe également de nombreux kits commerciaux pour les extraire. La quantification de l'ADN extrait ou mesure de biomasse moléculaire est sensible à la physico-chimie du milieu étudié et peut constituer une première bioindication de l'état microbiologique du sol. A travers des programmes tels que le RMQS (Référentiel de Mesure de la Qualité des Sols), des référentiels biogéographiques pour les sols français sont disponibles (Dequiedt et al. 2011), bien qu'une comparaison avec un sol de référence local peut être également recommandée.

PCR quantitative (qPCR)

La qPCR (réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel) est une technique de biologie moléculaire qui permet de mesurer l'abondance de gènes connus. La mesure de l'abondance de gènes microbiens permet de quantifier la biomasse microbienne (bactérienne, archéenne ou fongique) présente ou un potentiel génétique du milieu à dégrader ou à transformer un polluant ou à réaliser une activité métabolique (cycles biogéochimiques par exemple).

La qPCR mesure l'abondance d'un gène présent lorsqu'elle cible l'ADN ou son expression lorsqu'elle cible l'ARN (après une étape de transcription reverse de l'ARN en ADN). L'amplification par PCR consiste à dupliquer de manière exponentielle et maîtrisée un fragment d'ADN contenu dans un échantillon. Le début de cette amplification est proportionnel à la quantité d'ADN cible dans le milieu et permet de déterminer un seuil (Cq) (Figure 2) qui, rapporté à une gamme étalon, permet de déduire le nombre de copies du gène. Cette approche nécessite de connaître le gène ciblé afin de l'amplifier spécifiquement.

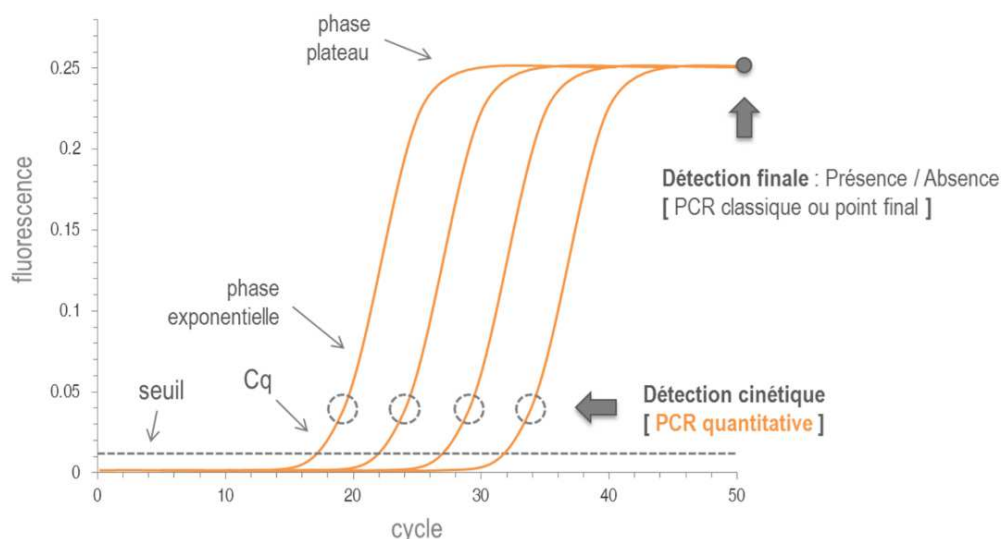


Figure 2. Principe de la qPCR (extrait des fiches techniques innovantes <http://ssp-infoterre.brgm.fr/fiches-sites-sols-pollues-techniques-innovantes>)

Séquençage haut-débit d'amplicons ciblés

Le séquençage haut-débit est une technique de biologie moléculaire qui permet de séquencer un très grand nombre de brins d'ADN. L'approche la plus avancée et opérationnelle (métagénomique ciblée ou metabarcoding) cible un gène d'intérêt connu : un fragment défini de ce gène est amplifié par PCR et les amplicons sont séquencés à haut-débit (Figure 3). Le séquençage haut-débit génère plusieurs milliers de séquences et l'analyse bioinformatique de ces métadonnées permet d'appréhender précisément la diversité du gène ciblé et l'abondance relative des différents taxons identifiés. Appliquée par exemple au gène codant l'ARNr 16S, marqueur universel des bactéries, cette approche permet l'étude de la biodiversité bactérienne et archéenne d'un compartiment environnemental (sols, eaux...). En effet, l'analyse des séquences renseigne sur l'identité et l'abondance relative des microorganismes présents dans un milieu. Les connaissances sur le rôle de certains taxons dans les cycles biogéochimiques connus donnent un aperçu du potentiel métabolique de la microflore de l'environnement étudié. L'impact d'une pollution sur la microflore du site peut être évaluée ainsi que la présence de taxons impactant les polluants. En plus du séquençage de gènes universels tels que celui codant l'ARNr 16S, la méthode peut également être utilisée sur d'autres marqueurs, notamment sur des gènes de dégradation ou transformation des polluants, pour caractériser la diversité et l'abondance relative de groupes métaboliques définis. Le séquençage ciblé du gène codant l'ARNr 16S fournit une identification des microorganismes présents au niveau du genre et une indication de leur abondance relative dans un milieu donné.

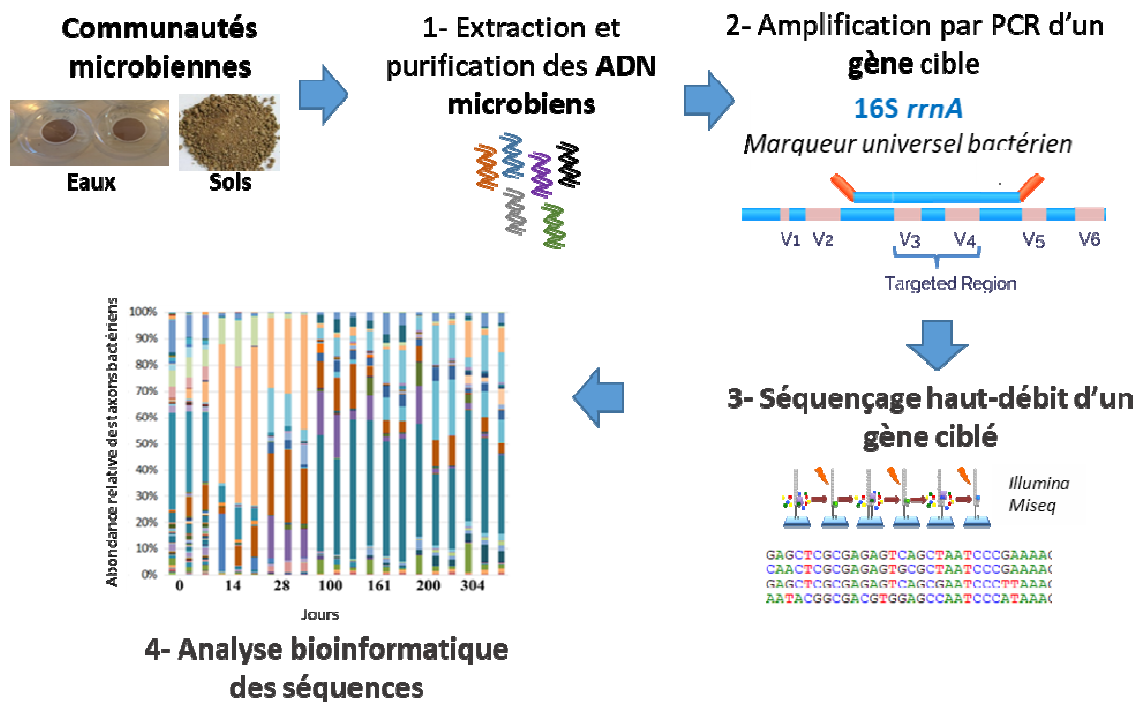


Figure 3. Les étapes du séquençage haut-débit (figure issue des fiches techniques innovantes <http://ssp-infoterre.brgm.fr/fiches-sites-sols-pollues-techniques-innovantes>)

Autres technologies omiques : les outils de demain ?

La métatranscriptomique

La métatranscriptomique consiste à séquencer de manière aléatoire les ARN messagers microbiens qui peuvent être utilisés pour identifier la régulation et l'expression des fonctions biologiques d'une communauté microbienne, basé sur l'ARN transcrit dans différentes conditions (Nair and Raja 2017). L'avantage majeur de travailler sur les ARN d'une communauté est d'en étudier la fraction « active ». En effet, l'ADN permet d'identifier « qui est là » mais l'ARN permet d'identifier « qui est là et qui est actif, voire qui fait quoi ». Aujourd'hui la limite majeure d'utilisation des ARN est leur demi-vie courte et la difficulté de d'extraction dans la matrice sol.

La métaprotéomique

L'analyse de la biodiversité fonctionnelle des communautés microbiennes peut également être appréhendée à travers l'étude des protéines produites par les microorganismes. La métaprotéomique consiste en l'étude de l'ensemble des protéines isolées d'un échantillon environnemental et permet une visibilité fonctionnelle des communautés (Nair and Raja 2017). La procédure requière une extraction des protéines du sol, leur séparation avec des approches d'électrophorèse à deux dimensions et enfin l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Les difficultés de la métaprotéomique résident en l'extraction des protéines du sol qui s'avère être une faible source de protéines et le manque de référentiels pour identifier les protéines (Bastida et al. 2009). Une fois que ces questions seront résolues, la métaprotéomique pourrait fournir des informations sur l'état biogéochimique des sols et les bioréactions qui s'y produisent et être utilisée comme bioindicateur de la qualité des sols (Bastida et al. 2009).

La métabolomique

La métabolomique permet de réaliser des cartographies des profils métaboliques d'une communauté microbienne. Basée sur l'extraction et l'analyse chimique des métabolites produits par les microorganismes (acides aminés, acides organiques...) elle permet de mesurer des impacts de changements environnementaux sur les métabolismes bactériens ou de reconstruire des voies métaboliques (Nair and Raja 2017). Cette méthode offre donc la possibilité de révéler des voies métaboliques complexes dans les communautés microbiennes des sols et d'avoir une cartographie de

la fonctionnalité des sols. Cependant, il est encore nécessaire d'étudier ces profils métaboliques dans différentes situations afin de disposer de référentiels et permettre l'utilisation de ces approches pour une évaluation quantitative de la qualité des sols (Withers et al. 2020).

Quelle application de ces approches dans le cadre d'une réhabilitation écologique ?

Tous les approches d'écologie microbienne moléculaire sont issues de laboratoires de recherche. Bien que certaines de ces méthodes telles que la (méta)transcriptomique, la (méta)protéomique, la (méta)bolomique ou le séquençage global dans les sols ne soient pas encore assez mûrs pour des applications en routine de diagnostic du fonctionnement des sols, elles offriront demain de nouvelles perspectives de diagnostic. Les approches de génomique ou métagénomique sont par contre plus développées et les avancées ces dernières années en termes de génération et traitement des métadonnées les rendent accessibles *via* des prestataires de service. Elles tendent vers l'opérationnalité grâce notamment à la création progressive de référentiels tels que celui du RMQS porté par l'INRA et qui a conduit à la publication de l'atlas français des bactéries du sol (Karimi et al., 2019). A travers différents projets de recherche à différents échelles (dont le programme Bioindicateurs de l'ADEME¹, des projets européens tels que ECOFINDERS²) et des approches expérimentales, les connaissances en écologie microbienne des sols ont très fortement progressé ces dernières années et permettent une appréciation globale de l'état fonctionnel des sols. On sait aujourd'hui que la biodiversité microbienne des sols influence la stabilité et le fonctionnement des communautés (Tardy et al. 2014) et l'on voit émerger des recommandations pour l'utilisation de ces bioindicateurs dans la gestion de la fertilité des sols, en particulier des sols agricoles (Lemanceau et al. 2015).

D'autres approches proposées dans la matrice du projet RECORD sont la quantification de gènes spécifiques impliqués dans des cycles biogéochimiques tels que le cycle de l'azote qui va jouer un rôle central dans la fonctionnalisation des sols. Ces approches ne disposent pas aujourd'hui de référentiels d'interprétation et sont davantage étudiées dans des projets de recherche. Elles permettent de conclure sur l'état fonctionnel d'un sol et une re-fonctionnalisation en interprétant les données en fonction de celles d'un sol témoin non perturbé par exemple. Il sera nécessaire de mettre en place de nouveaux référentiels pour interpréter correctement ces données quantitatives et également compter sur leur déploiement plus massif qui permettrait d'enrichir les connaissances et d'améliorer les diagnostics.

Conclusion : les enjeux de demain

Les approches omiques apportent une compréhension très fine de la diversité et du fonctionnement des sols. Cependant, comme discuté dans cette note, à ce jour seul un nombre restreint d'approches peut être utilisé en routine comme bioindicateurs des sols avec des référentiels d'interprétation qui restent encore très insuffisants. De plus, bien que la littérature scientifique et technique soit très riche dans des contextes agricoles, les données restent encore à acquérir sur les sols dégradés et réhabilités.

Parmi les enjeux de demain nous pouvons donc citer :

- La construction de référentiels en fonction des types de sols et surtout en fonction des enjeux et fonctions ciblés par la réhabilitation (par usage) ;
- Le transfert technique de la recherche vers l'appliqué qui émerge concrètement par le développement de startup tels que Novasols-Experts (<https://novasol-experts.com>), Sol&Co (<https://sol-et-co.com>) ou Argaly (<https://www.argaly.com>) et des avancées technologiques pour vulgariser d'avantage les approches « méta » ;
- Le développement de nouvelles méthodes et outils tels que la miniaturisation du séquençage avec le Minion (Oxford Nanopore Technologies), la diminution des coûts des approches et la

¹ <https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/>

² <https://projects.au.dk/ecofinders/>

normalisation des techniques d'un bout à l'autre de la chaîne pour permettre la comparaison de données à grande échelle.

Références

- Ademe. 2017. Microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental. 174 p.
- Bastida, F., Moreno, J. L., Nicolás, C., Hernández, T., & García, C. (2009) Soil metaproteomics: a review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. *European Journal of Soil Science*, 60, 845-859.
- Biswas, R. & Sarkar, A. (2018). 'Omics' Tools in Soil Microbiology: The State of the Art. In *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects: Volume 1: Soil-Microbe Interaction*, eds. T. K. Adhya, B. Lal, B. Mohapatra, D. Paul & S. Das, 35-64. Singapore: Springer Singapore.
- Bouchez, T., Blioux, A.-L., Dequiedt, S., Domaizon, I., Dufresne, A., Ferreira, S., Godon, J.-J., Hellal, J., Joulian, J., Quaiser, A., Martin-Laurent, F., Mauffret, A., Monier, J.-M., Peyret, P., Schmitt-Koplin, P., Sibourg, O., d'Oiron, E., Bispo, A., Deportes, I., Grand, C., Cuny, P., Maron, P.-A., & Ranjard, L. (2017) La microbiologie moléculaire au service du diagnostic environnemental. *Etude et Gestion des Sols*, 24, 9-31.
- Denonfoux, J., Parisot, N., Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Boucher, D., Morgavi, D.P., Le Paslier, D., Peyretailade, E., & Peyret, P. (2013) Gene Capture Coupled to High-Throughput Sequencing as a Strategy for Targeted Metagenome Exploration. *DNA Research*, 20, 185-196.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P. & Ranjard, L. (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 641-652.
- Dugat-Bony, E., Peyretailade, E., Parisot, N., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., Hill, D., Rimour, S., & Peyret, P. (2012) Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environmental Microbiology*, 14, 356-371.
- Feng, Y.Y. (2013) Omics breakthroughs for environmental microbiology. *Omics Environ Microbiol* 40:18–33.
- Garlapati, D., B. Charankumar, K. Ramu, P. Madeswaran & M. V. Ramana Murthy (2019) A review on the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18, 389-411.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy & R. M. Goodman (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5, R245-R249.
- Karimi, B., Chemidlin Prévost-Bouré, N., Dequiedt, S., Terrat, S. et Ranjard, L. 2018. Atlas Français des bactéries du sol, Biotope, Mèze, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 192p.
- Lemanceau, P., P.-A. Maron, S. Mazurier, C. Mougel, B. Pivato, P. Plassart, L. Ranjard, C. Revellin, V. Tardy & D. Wipf (2015) Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 67-81.
- Nair, G. R. & S. S. S. Raja (2017) Decoding Complex Soil Microbial Communities through New Age “ Omics ”. *Journal of Microbiol and Biochemical Technology*, 9, 301-309.
- Ranjard, L., F. Poly & S. Nazaret (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment %J Research in Microbiology. 151, 167-177.
- Ruppert, K. M., R. J. Kline & M. S. Rahman (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.

- Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018 *Environmental DNA For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford university Press.
- Tardy, V., O. Mathieu, J. Lévêque, S. Terrat, A. Chabbi, P. Lemanceau, L. Ranjard & P.-A. Maron (2014) Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6, 173-183.
- Terrat, S., P. Plassart, E. Bourgeois, S. Ferreira, S. Dequiedt, N. Adele-Dit-De-Renseville, P. Lemanceau, A. Bispo, A. Chabbi, P.-A. Maron & L. Ranjard (2015) Meta-barcoded evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure to characterize soil bacterial and fungal community diversity and composition. *Microbial Biotechnology*, 8, 131-142.
- Withers, E., P. W. Hill, D. R. Chadwick & D. L. Jones (2020) Use of untargeted metabolomics for assessing soil quality and microbial function. *Soil Biology and Biochemistry*, 143, 107758.