



OligoGen : Développement de méthodes oligochètes génétiques pour évaluer la qualité biologique des sédiments de cours d'eau - Synthèse

Régis Vivien¹, Kristina Cermakova², Jan Pawlowski², Benoit J.D. Ferrari¹

¹Swiss Centre for Applied Ecotoxicology, Lausanne/Dübendorf, Switzerland

²ID-Gene ecodiagnosics, Campus Biotech Innovation Park, 1202 Geneva, Switzerland

Problématique des sédiments

Les sédiments sont une composante essentielle des écosystèmes fluviaux et lacustres et agissent comme récepteurs naturels pour beaucoup de contaminants (par exemple : métaux, HAP, PCB, pesticides organochlorés). Le manque de prise en compte du compartiment sédimentaire dans le cadre des programmes de surveillance peut conduire à des conclusions trop optimistes sur la qualité des cours d'eau. Il est crucial d'évaluer la qualité de ce compartiment pour déterminer s'il peut contribuer à la dégradation d'un écosystème.

Les oligochètes, bioindicateurs de la qualité des sédiments

Les oligochètes conviennent parfaitement pour l'évaluation in situ de la qualité biologique des sédiments. En effet, ils sont inféodés à ce compartiment, se déplacent peu et ont comme mode trophique essentiellement l'ingestion de sédiments fins. De plus, le groupe comprend un grand nombre d'espèces présentant des degrés très divers de sensibilité à la pollution, et les oligochètes sont généralement abondants dans les sédiments. L'Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments (IOBS) a été développé spécifiquement pour évaluer la qualité biologique des sédiments fins/sableux dans les cours d'eau. Cet indice est avant tout un indicateur des pollutions de type toxique (Vivien et al., 2020a) et son application permet ainsi de compléter l'information écologique fournie par les autres bioindicateurs (IBCH et DI-CH). Cet indice a été appliqué en routine par le Service de l'écologie de l'eau du canton de Genève entre 2010 et 2013 (Vivien et al., 2015; 2020a) et de manière ponctuelle par d'autres cantons (Vaud et Valais).

Identification des oligochètes à l'aide de codes-barres génétiques

L'identification morphologique des oligochètes à l'espèce est cependant difficile et seule une partie des spécimens présents dans un échantillon peut généralement être identifiée à l'espèce. L'utilisation de codes-barres génétiques faciliterait nettement l'identification des oligochètes aquatiques et l'établissement de diagnostics écologiques. Le séquençage à haut débit permet l'analyse moléculaire d'un grand nombre

d'échantillons en même temps et a été proposé comme un moyen efficace pour évaluer la biodiversité dans les programmes de suivi de la qualité des milieux. L'ADN analysé par séquençage à haut débit peut être extrait à partir de différents types d'échantillons, par ex. des sédiments, de mélanges de spécimens ou de spécimens isolés.

Précédents projets sur le développement d'indices oligochètes génétiques

Dans des projets antérieurs, nous avons d'une part créé une base de données de référence des séquences du code-barre COI (=cytochrome c oxydase) des oligochètes aquatiques basée sur l'analyse de spécimens collectés en Suisse et d'autre part déterminé des seuils de divergence génétique appropriés pour distinguer les différentes espèces d'oligochètes (Vivien et al., 2017; 2020b). De plus, nous avons testé différentes méthodes de metabarcoding d'ADN(e) (analyse du sédiment total, de sédiments tamisés et de mélanges d'oligochètes) ainsi qu'une méthode basée sur le séquençage à haut débit de spécimens d'oligochètes marqués génétiquement (SHDspm) (Vivien et al., 2019; 2020b). Pour cette dernière méthode, un certain nombre d'individus sont sortis de l'échantillon, l'ADN est extrait à partir de chaque individu (un extrait d'ADN par individu), et le gène COI de chaque extrait d'ADN est amplifié par PCR au moyen de primers (=amorces) marqués (une paire de tags unique pour chaque individu). Les résultats (notes d'indice, abondances des espèces) obtenus avec la méthode SHDspm ont été très concordants avec ceux de la méthode traditionnelle.

Projet OligoGen

Les buts principaux du projet OligoGen étaient de tester la méthode SHDspm sur 25 nouveaux sites répartis dans plusieurs cantons suisses, de tenter de la rendre applicable en routine et d'enrichir la base de données suisse de référence des séquences COI des oligochètes aquatiques. Les autres buts étaient de tester sur une partie de ces sites des méthodes de metabarcoding basées sur l'analyse de l'éthanol préservant le matériel tamisé (SHDéth) et de mélanges de spécimens d'oligochètes (SHDmél). Pour cette dernière méthode, la même quantité de tissus entre spécimens a été incorporée dans chaque mélange.

Principaux résultats du projet

Des corrélations très significatives entre les valeurs de l'IOBS calculées avec les données morphologiques et celles calculées avec les données de chacune des trois méthodes génétiques ont été obtenues. La concordance entre les résultats de la morphologie et ceux des méthodes de metabarcoding a pu être améliorée en adaptant pour les données génétiques le calcul de l'indice IOBS et les limites de classes de qualité. La méthode SHDspm s'est toutefois avérée nettement plus fiable que les méthodes SHDéth et SHDmél pour estimer les abondances des espèces, familles et sous-familles présentes dans les échantillons. Les méthodes SHDéth et SHDmél avaient tendance entre autres à sous-estimer nettement les abondances des Naidinae et des Enchytraeidae. La méthode SHDspm présente donc l'avantage de pouvoir permettre de compléter le diagnostic établi sur la base de la seule note de l'indice IOBS en analysant les pourcentages des différentes espèces présentes dans un échantillon. La base de données COI de référence des oligochètes aquatiques a été enrichie de 78 nouvelles lignées (lignée = espèce), la plupart ayant été obtenues grâce au séquençage à haut débit. La base de données comprend actuellement 184 lignées.

Etat d'avancement du développement des différentes approches

Bien qu'ayant pu être validée dans le cadre de ce projet, la méthode SHDspm n'a toutefois pas pu être adaptée pour les analyses de routine, la méthode d'extraction d'ADN développée pour ce projet n'ayant pas permis d'obtenir un taux de succès d'amplification (PCR) suffisamment élevé. Cette méthode telle qu'appliquée dans le cadre de ce projet peut toutefois déjà être utilisée pour évaluer la qualité biologique des sédiments, mais le coût de l'analyse par échantillon est élevé. Les méthodes SHDéth et SHDmél n'ont pas pu être validées dans le cadre de ce projet en raison du nombre de données encore peu élevé et surtout du fait de la difficulté d'estimer correctement les abondances des espèces, sous-familles et familles. Ces biais et en particulier ceux obtenus avec la méthode SHDmél pourraient en partie être expliqués par la méthode d'extraction d'ADN utilisée. Le tableau 1 présente les avantages, les limites, l'applicabilité et les nécessités de développement des différentes méthodes.

Perspectives

Les perspectives sont d'optimiser les étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification de l'ADN par PCR pour permettre l'application de la méthode SHDspm en routine et de continuer l'enrichissement de la base de données COI de référence. Les méthodes SHDéth et SHDmél nécessiteront un développement important, incluant le test de ces méthodes en appliquant d'autres méthodes d'extraction de l'ADN que celle utilisée dans le cadre de cette étude et, si les résultats ne s'améliorent pas significativement, le test de l'application de facteurs de correction aux nombres de reads (séquences) obtenus et la mise au point et l'utilisation de primers spécifiques des oligochètes.

Références

Vivien R., Lafont M., Ferrari B.J.D. 2015. Utilisation des communautés d'oligochètes pour l'évaluation de la qualité biologique et du fonctionnement des cours d'eau : un bilan à partir de données genevoises (Suisse). *Archives des Sciences* 68: 105-113.

Vivien R., Holzmann M., Werner I., Pawlowski J., Lafont M., Ferrari B.J.D. 2017. Cytochrome c oxidase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database. *PeerJ* 5:e4122.

Vivien R., Apothéoz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., Werner I., Ferrari B.J.D. 2019. Testing different metabarcoding approaches to assess aquatic oligochaete diversity and the biological quality of sediments. *Ecological Indicators* 106:105453.

Vivien R., Casado-Martinez C., Lafont M., Ferrari B.J.D. 2020a. Effect thresholds of metals in stream sediments based on in situ oligochaete communities. *Environments* 7, 31.

Vivien R., Apothéoz-Perret-Gentil L., Pawlowski J., Werner I., Ferrari B.J.D. 2020b. High-throughput DNA barcoding of oligochaetes for abundance-based indices to assess the biological quality of sediments in streams and lakes. *Scientific Reports* 10, 2041.

Tableau 1 : Avantages, limites, applicabilité et perspectives de développement des méthodes basées sur le séquençage à haut débit des spécimens marqués génétiquement (SHDspm), de l'éthanol (SHDéth) et des mélanges de spécimens (SHDmél) ; * valeurs obtenues après modification du calcul de l'indice (IOBSgen)

	Avantages	Limites	Applicabilité	Perspectives
Méthode SHDspm	<p>Corrélations très significatives entre valeurs d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques (n=29, $R^2=0,87$, $p=2,7*10^{-13}$)</p> <p>Tri aléatoire des spécimens et identification individuelle permet une représentativité optimale des principales espèces présentes dans un échantillon</p> <p>Estimations correctes des abondances des espèces, familles et sous-familles → les pourcentages des différentes espèces sont utilisables pour compléter/corriger les diagnostics écologiques établis sur la base de la seule note de l'indice IOBS</p> <p>Par rapport à la morphologie, chaque individu est identifié à l'espèce (lignée) et identifications très fiables</p>	<p>Coût de l'analyse nettement plus élevé que le coût de l'indice IOBS classique. Le coût estimé par site avec la méthode génétique est estimé à environ CHF 2000-2400, alors que celui de l'analyse morphologique est estimé à environ CHF 1200.</p>	<p>Méthode validée, mais du développement est nécessaire pour diminuer le coût de l'analyse</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Tester la méthode avec guanidine en optimisant les conditions des PCR et sans les étapes de vérification des amplifications sur gel et de quantification d'ADN - tester d'autres méthodes d'extraction d'ADN avec des kits commerciaux (si possible automatisables)
Méthode SHDéth	<p>Corrélations très significatives entre valeurs d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques (n=20, $R^2=0,81$, $p=7*10^{-8}$)*</p> <p>Forte capacité de détection des espèces, y compris des espèces très peu abondantes dans un échantillon</p> <p>Pas de tri manuel des spécimens après tamisage du sédiment → coût de l'analyse avantageux en mode screening (biodiversité) (estimé à CHF 800)</p>	<p>Biais dans l'estimation des abondances des espèces, familles et sous-familles → pas de possibilité d'utiliser les pourcentages des espèces pour compléter/corriger les diagnostics écologiques établis sur la base de la seule note de l'indice IOBS</p> <p>L'absence de tri des spécimens peut entraîner une représentativité insuffisante d'un certain nombre d'espèces présentes dans un échantillon, par ex. celles de petite taille</p>	<p>Méthode non validée, nécessite du développement pour réduire les biais des abondances des espèces, familles et sous-familles.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Prioritaire: tester la méthode SHDmél en appliquant d'autres méthodes d'extraction que le kit Qiagen - Développer et utiliser des primers spécifiques des oligochètes - Application de facteurs de correction des nombres de reads (séquences)
Méthode SHDmél	<p>Corrélations très significatives entre valeurs d'IOBS obtenues à partir des données morphologiques et génétiques (n=9, $R^2=0,92$, $p=4,6*10^{-5}$; n=8, $R^2=0,85$, $p=0,001$)*</p> <p>Tri aléatoire des spécimens et découpe des spécimens (quantité de tissu similaire entre spécimens) permet de favoriser une représentativité des principales espèces présentes dans un échantillon</p>	<p>Biais dans l'estimation des abondances des espèces, familles et sous-familles → pas de possibilité d'utiliser les pourcentages des espèces pour compléter/corriger les diagnostics écologiques établis sur la base de la seule note de l'indice IOBS</p> <p>Coût par site équivalent à celui de l'analyse morphologique (CHF 1200)</p>	<p>Méthode non validée, nécessite du développement pour réduire les biais des abondances des espèces, familles et sous-familles.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Prioritaire: tester la méthode SHDmél en appliquant d'autres méthodes d'extraction que le kit Qiagen - Développer et utiliser des primers spécifiques des oligochètes - Application de facteurs de correction des nombres de reads (séquences)