



Thèse CIFRE Asconit consultants - INRA CARTEL

Barcoding et Biomonitoring :

développement d'outils innovants de bioindication des écosystèmes aquatiques basés sur les diatomées et sur les nouvelles techniques de séquençage à haut-débit. Application à la bioindication de la qualité des cours d'eau de Mayotte.

L'objectif de la thèse est de développer des outils moléculaires pour l'identification des diatomées afin d'améliorer l'utilisation de ces microorganismes comme bioindicateurs de la qualité des eaux. Ce travail s'inscrit dans le cadre général de l'application de la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (évaluation de l'état écologique des masses d'eau) à Mayotte, à la demande de l'ONEMA (Office National des Eaux et des milieux aquatiques).

La DCE (Directive Cadre sur l'Eau), adoptée en 2000, requiert d'évaluer l'état écologique des masses d'eau et demande à ce qu'elles atteignent le bon état écologique à l'horizon 2015. Cette directive s'applique aussi bien aux rivières de métropole, qu'aux rivières des DOM (Départements d'Outre Mer). Cet état écologique doit être évalué au moyen de différents indicateurs chimiques et biologiques dont les diatomées font partie (Indice Biologique Diatomées, indice normalisé en 2000). Pour cela, des évaluations précises en termes de composition spécifique et d'abondance de leurs peuplements sont requises.

L'identification des diatomées est réalisée à ce jour par microscopie optique, en fonction des critères morphologiques de leur exosquelette siliceux (frustule). Cependant cette méthodologie nécessite une expertise taxonomique forte associée à un temps d'analyse important par échantillon, ce qui entraîne un coût élevé pour la société et limite l'utilisation de cet outil de bioindication à plus large échelle. Les techniques de biologie moléculaire sont des alternatives aux observations microscopiques pour étudier les diatomées. Plusieurs études ont démontré l'intérêt des marqueurs nucléiques (approches de barcoding) sur quelques espèces de diatomées (Kermarrec et al 2012, Kermarrec et al 2013b, Rimet et al 2012). De plus le développement actuel des nouvelles technologies de séquençage à haut-débit (NGS) permet de développer des méthodes intéressantes tant en précision qu'en coût. Des travaux précédents sur macro-invertébrés (Hajibabaei et al 2011) et sur diatomées (Kermarrec et al 2013a, Kermarrec et al 2013c) ont montré le potentiel de ces approches pour la bioindication.

Des échantillons de diatomées d'un réseau de sites destinés à la mise en place de métriques de bioindication sur Mayotte seront prélevés et analysés par une double approche moléculaire (NGS) / microscopie. Ces échantillons permettront:

- de valider l'utilisation des marqueurs rbcL et 18SV4 proposés et testés par Kermarrec et al (2013) et Zimmermann et al (2011), et d'évaluer leur potentiel 1/ à fournir un inventaire d'espèces de bonne qualité et 2/ à quantifier l'abondance des espèces détectées dans des échantillons environnementaux.
- d'optimiser les conditions de préparation des échantillons pour une approche NGS à différentes étapes : extraction ADN et PCR dans le but de pouvoir standardiser ce type d'approche.
- de tester différentes technologies NGS : illumina, PGM, et d'évaluer leur intérêt respectif (taux d'erreur, facilité, rapidité, coût).



- de tester différentes approches bioinformatiques de traitement des données de séquence issues des NGS : distance, phylotypage, clustering. Notamment l'intérêt de chacune de ces méthodes dans le contexte de Mayotte, où l'on connaît peu de chose sur la taxonomie et l'écologie des espèces sera évalué. En collaboration avec un autre doctorant, ces données seront utilisées avec différentes métriques de bioindication et comparées quant à leur capacité à évaluer la qualité des cours d'eau mahorais.

- ces travaux déboucheront sur une proposition de méthodologie allant du prélèvement de l'échantillon sur un site jusqu'à la note de qualité de ce site.

- ces approches développées sur diatomées seront testées sur des données similaires obtenues pour les communautés de macroinvertébrés.

Ce travail se fera dans le cadre d'un projet INRA-ONEMA planifié dans deux accord-cadres INRA-ONEMA successifs (2013-15 puis 2016-18). Les aspects de taxonomie morphologique (microscopie) et moléculaire (metabarcoding) seront réalisés par le doctorant à l'INRA CARTEL (Thonon), en bénéficiant de l'expertise d'Asconit pour la taxonomie des diatomées de Mayotte et pour les approches de metabarcoding sur diatomées. Des approches similaires sur macroinvertébrés seront réalisées en collaboration avec M. Hajibabaei (Biodiversity Institute, Guelph University, Canada). Le séquençage (barcoding et metabarcoding) sera réalisé sur une plateforme dédiée encore à définir (Plateforme transcriptomique de Bordeaux, GenoToul ou Hajibabaei lab). Le traitement bioinformatique des données sera réalisé en collaboration avec Alain Franc (INRA, BioGeCo) et les partenaires du projet du département Maths et Informatique Appliquées de l'INRA (INRA, MIG).

Compétences : biologie moléculaire. Des compétences complémentaires en hydrobiologie et/ou taxonomie des diatomées seront fortement appréciées.

Localisation principale: INRA, UMR CARTEL (Thonon-les-Bains). Autres localisations: Asconit Consultants (Lyon), séjours à Mayotte pour les périodes d'échantillonnage.

Ecole doctorale : SISEO, Université de Savoie (PRES de Grenoble)

Démarrage 1er trimestre 2014

Contacts: Agnès Bouchez: agnes.bouchez@thonon.inra.fr +33 450 26 78 60

Frédéric Rimet: frederic.rimet@thonon.inra.fr +33 450 26 78 74

références

- HAJIBABAEI M., SHOKRALLA S., ZHOU X., SINGER G.A., BAIRD D. (2011) Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE* 6: e17497.
- KERMARREC L., ECTOR L., BOUCHEZ A., RIMET F., and HOFFMANN L. (2011) A preliminary phylogenetic evaluation of the diatom order Cymbellales D.G. Mann based on 18S rDNA gene sequences. *Diatom Research* 26(3):305-315
- KERMARREC L., FRANC A., RIMET F., CHAUMEIL P., HUMBERT J.F., BOUCHEZ A. (2013a) Next Generation Sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources* 13(4):607-619
- KERMARREC L., BOUCHEZ A., RIMET F., HUMBERT J.F. (2013b) First evidence of the existence of semi-cryptic species and of a phylogeographic structure in the *Gomphonema parvulum* (Kützinger) Kützinger complex (Bacillariophyta). *Protist* 164:686-705
- KERMARREC L., FRANC A., CHAUMEIL P., RIMET F., FRIGERIO J.M., HUMBERT J.F., BOUCHEZ A. (2013c) A Next-Generation Sequencing approach for river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshwater Science* in press
- RIMET F., KERMARREC L., BOUCHEZ A., HOFFMANN L., ECTOR L. and MEDLIN L.K. (2011) Molecular phylogeny of the family Bacillariaceae based on 18S rDNA sequences: focus on freshwater *Nitzschia* of the section *Lanceolatae*. *Diatom Research* 26:273-291
- ZIMMERMANN, J., JAHN, R. & GEMEINHOLZER, B. (2011) Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, 11, 173–192.