

PREMIÈRE ÉVALUATION DE LA DIVERSITÉ DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES PLANCTONIQUES AU COURS D'ÉPISODES DE MORTALITÉ DES MOULES BLEUES EN FRANCE : UTILISATION DE L'APPROCHE DE MÉTABARCODING POUR L'ANALYSE DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL

Pépin J.F., Bouget J.F., Chabirand J.M., Chasselin L., Costes L., Grizon J., Lejolivet A., Le Noc S., Palvadeau H., Schmitt A., Seugnet J.L., P. Soletchnik, Travers M.A., Tourbiez D., Guesdon S.

1- Contexte : - De mars à mai 2014, des mortalités exceptionnelles ont été observées sur les moules en élevage (*Mytilus edulis*) dans les Pertuis charentais (plusieurs milliers de tonnes perdues sur filières et bouchots, Fig.1).

- A la suite des expertises réalisées par Ifremer sur cette « crise » (1)(2), la DPMA a financé l'Ifremer pour réaliser **une action de recherche spécifique d'étude des mortalités de moules BLEUES - MORBLEU- afin d'identifier et décrire les facteurs associés ou favorisant ces mortalités** (4)(5).

- Dans le cadre de cette étude, sur plusieurs sites côtiers contrastés en termes de niveaux de mortalités (Fig.2), le suivi environnemental opéré de 2015 à 2018 a consisté à mesurer : a) des paramètres abiotiques physico-chimiques (température, salinité, O₂, turbidité) ; à collecter des prélèvements d'eau de mer tous les 15 jours pour l'analyse : b) des sels nutritifs, c) des métaux traces, d) de la flore microphytoplanctonique, e) **des communautés microbiennes procaryotes et eucaryotes du pico et nano plancton.**

2- Objectifs : - Caractériser l'environnement biotique *in situ* lors des épisodes de mortalité de moules par des approches NGS (Next Sequencing Generation) afin de savoir si des modifications de la diversité et de la dynamique des communautés microbiennes sont associées à l'apparition de mortalités de moules.

- Dans ce contexte, nous avons réalisé pour la première fois un suivi basé sur l'utilisation du métabarcoding de l'ADN environnemental visant à décrire la diversité des communautés microbiennes de la colonne d'eau au cours des épisodes de mortalité. La stratégie du suivi, les méthodes retenues et le dispositif déployé sont présentés.

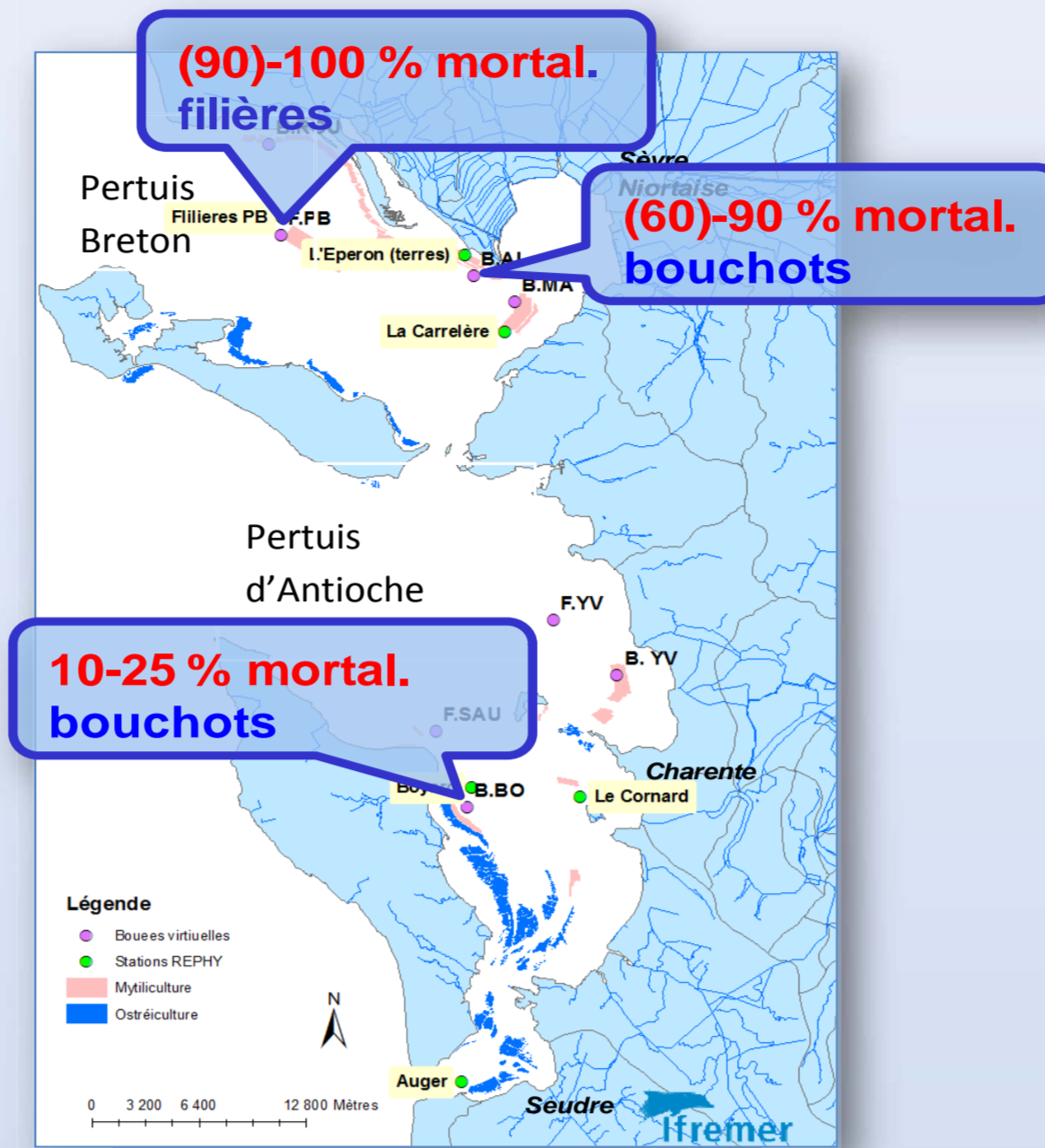


Figure 1 : Situation des mortalités cumulées de moules (%) en juin 2014 dans les pertuis (3)

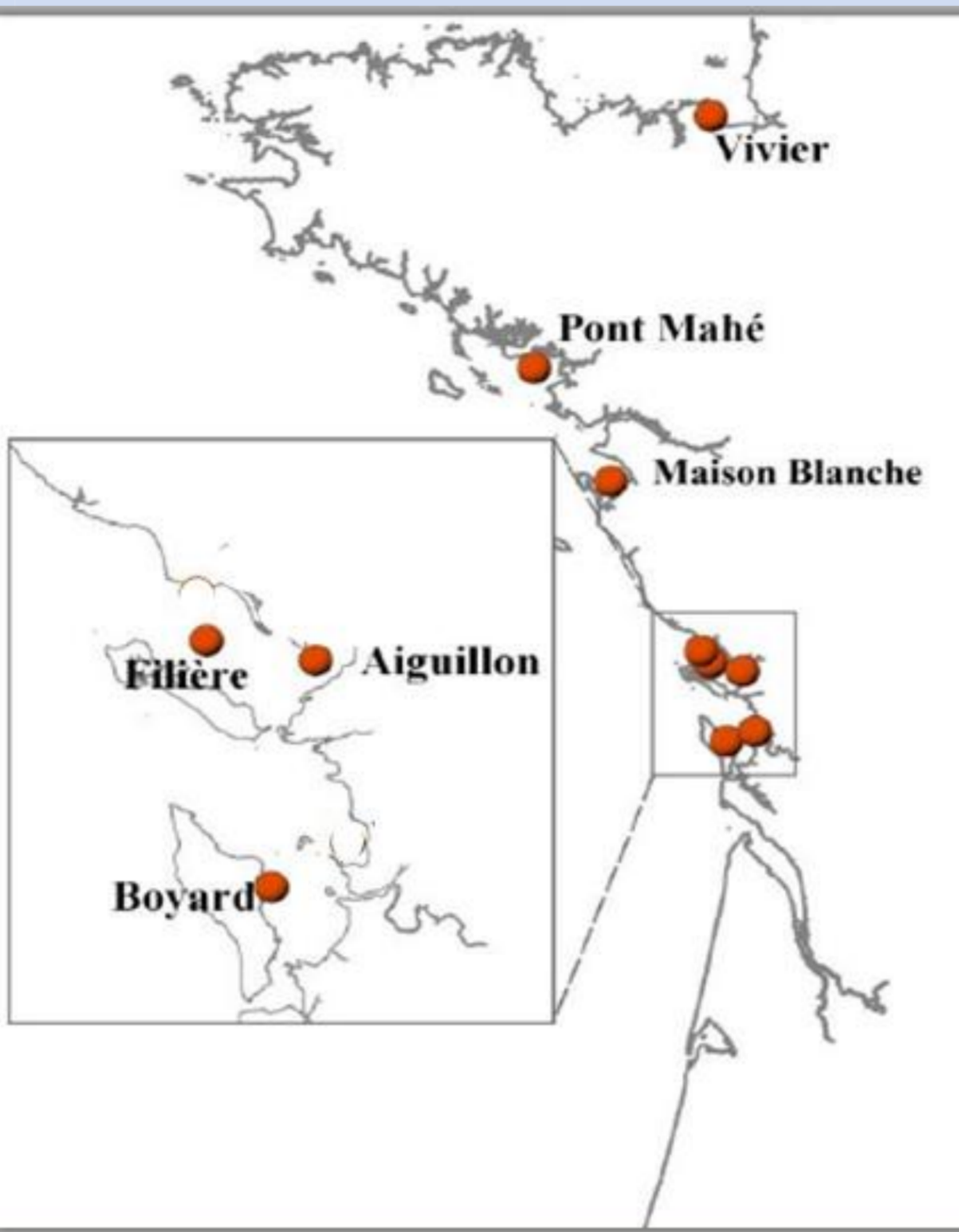


Figure 2 : Carte présentant les sites où ont été menés les suivis dédiés à l'action MORBLEU entre 2015 et 2018

Tableau 1: campagnes d'échantillonnage pour les stations suivies entre 2015 et 2018

Années	Période suivie	Nombre de jours prélevés	Nombre de stations suivies	Nom des stations
2015	janvier-juillet	17 dates	3	Filière, Aig-Eperon, Boyard
2016	février-juillet	14 dates	4	Filière, Aig-Eperon, Boyard, Maison Blanche (Noirm.)
2017	février-juin	12 dates	7	Filière, Aig-Eperon, Boyard, Maison Blanche (Noirm.), Pont Mahé, Loscolo, Vivier/mer
2018	mars-juin	14 dates	2	Filière, Boyard

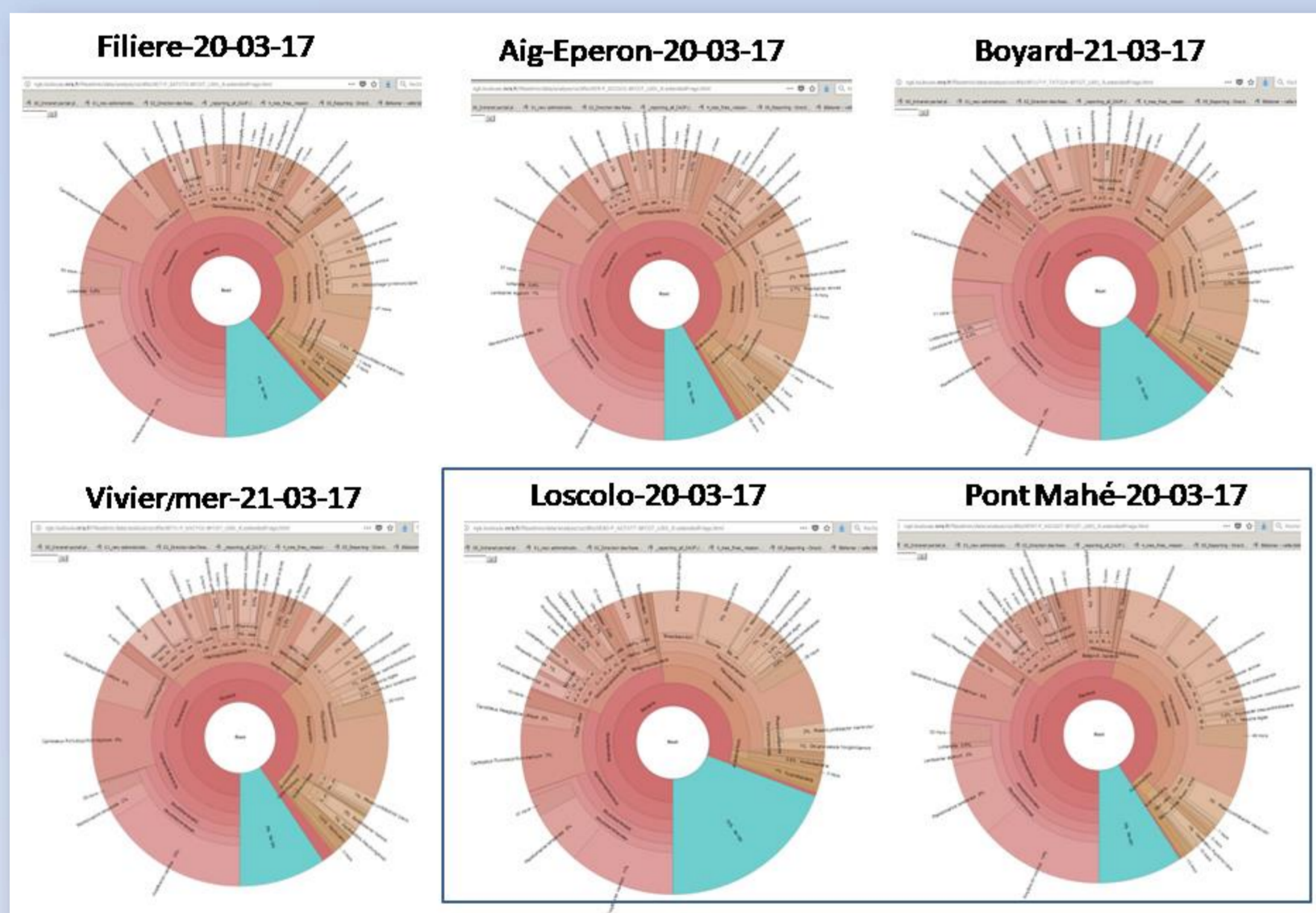


Figure 3 : Visualisation Krona du BLAST des séquences 16S de l'ADNe de 6 stations au 20-21/03/2017

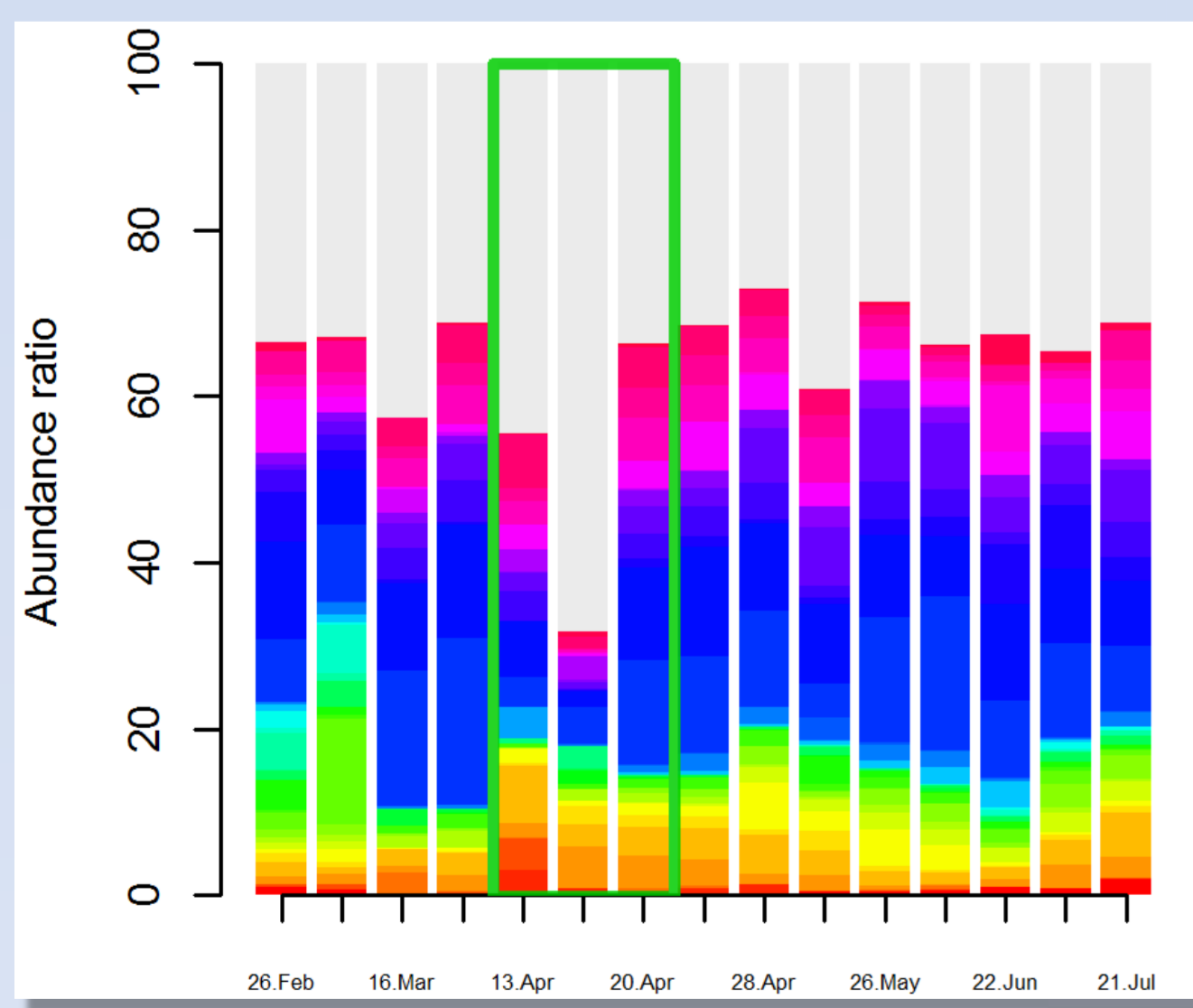


Figure 5: évolution des abondances relatives des OTUs (gène 16S rRNA procaryotes) à la station Filière à l'hiver-printemps 2015

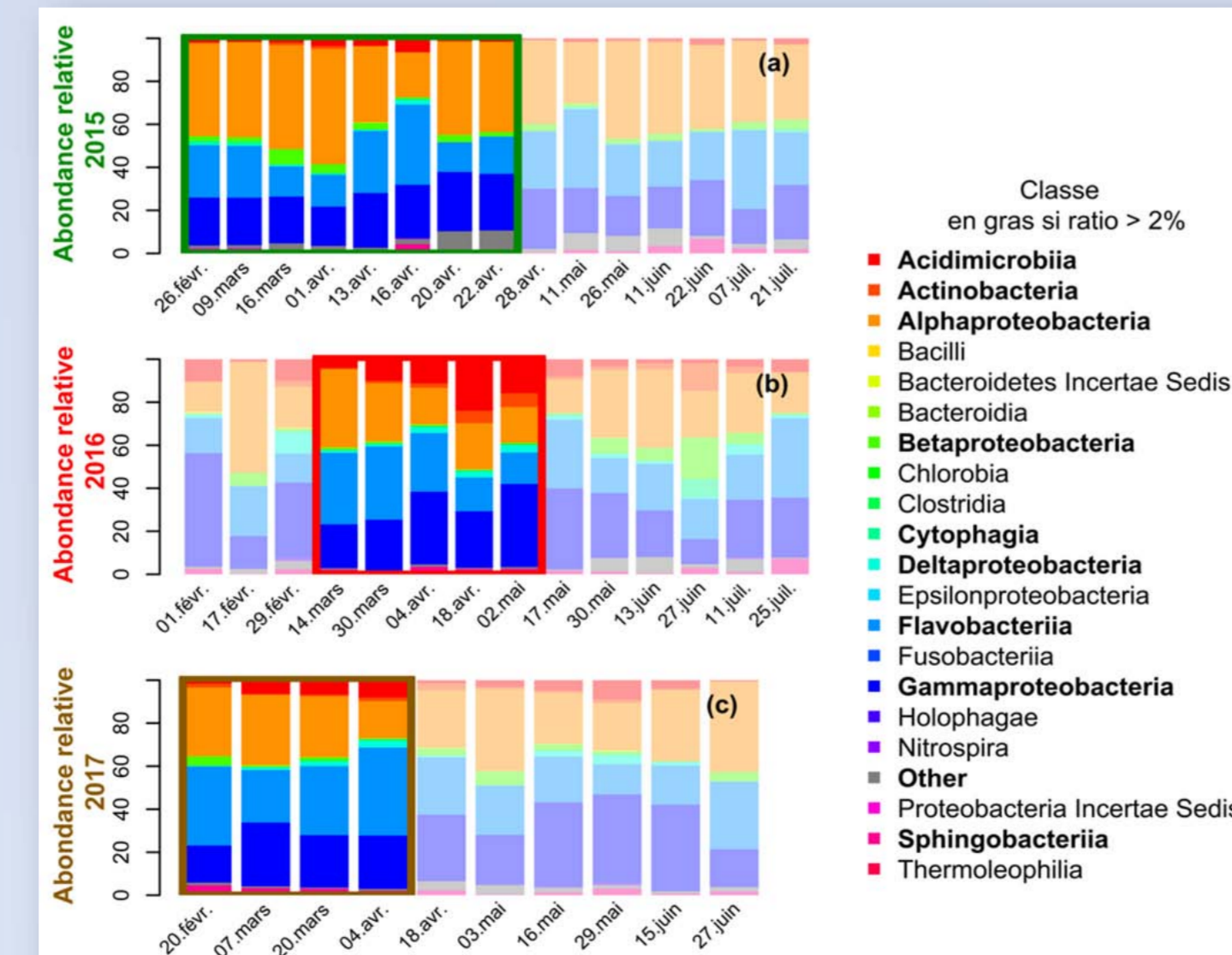


Figure 6: évolution hivernale et printanière de l'abondance relative des classes de bactéries en 2015 (a), 2016 (b) et 2017 (c) à la station Filière W

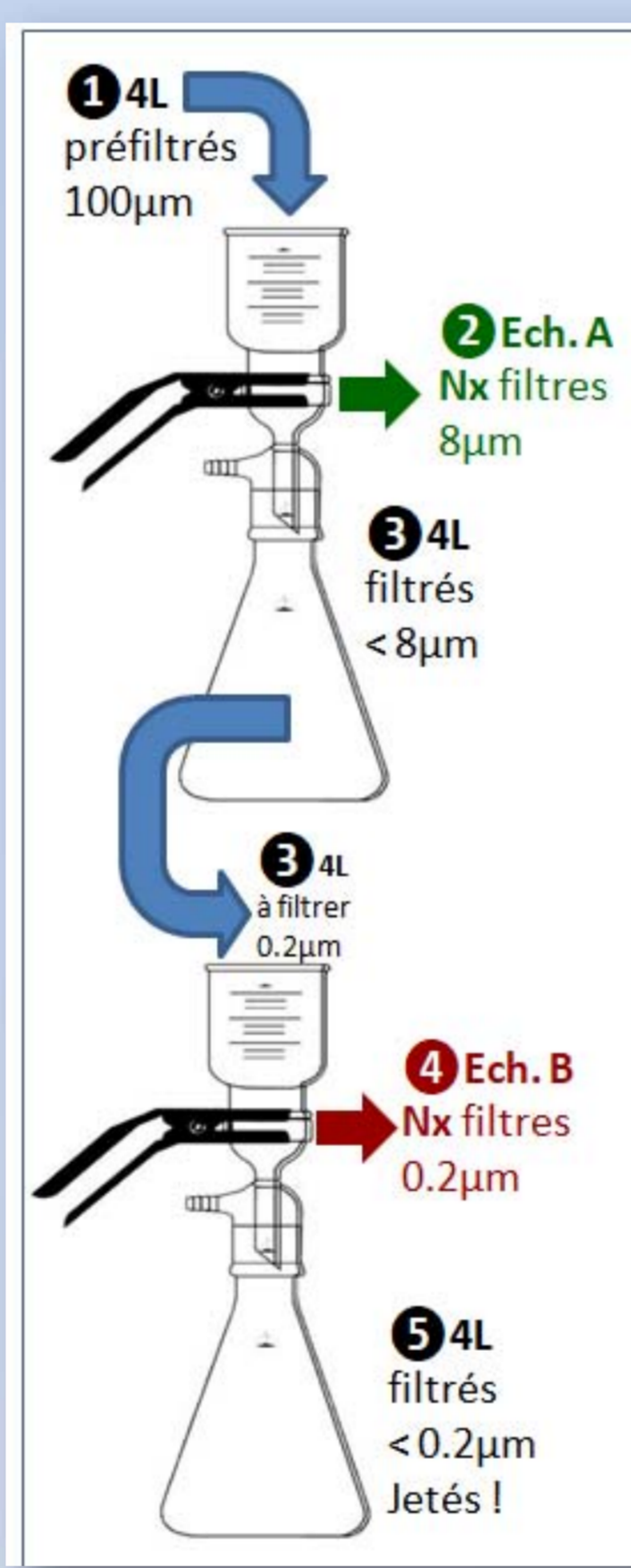


Figure 4: protocole de filtration séquentielle du prélèvement d'eau

3- Stratégie d'échantillonnage de l'eau de mer pour explorer la biodiversité de l'ADN environnemental

- Le principe retenu a été de pouvoir réaliser des prélèvements d'eau avant, pendant et après l'apparition des mortalités. Afin de pouvoir comparer la variabilité spatiale et temporelle des indices biotiques liés à l'ADNe entre les stations, un protocole commun stricte a été appliqué avec prélèvements sur sites le même jour +/-24h et à pleine mer +/-2h (exemple Fig. 3). Hors mortalité, le pas d'échantillonnage était de 15 jours, en cas de mortalité, le pas était raccourci à 3 jours x 3. Les campagnes à la mer ont été réalisées entre janvier et juillet sur trois à sept stations (Fig. 2, Tableau 1)

4- Méthodes :

a- Prélèvements d'eau in situ : - Les prélèvements d'eau de mer subsurface (-1m) ont été réalisés à partir d'embarcation sur site à l'aide d'une bouteille Niskin de 5L en respectant les procédures du REPHY (Ifremer, 2012). Quatre litres de l'eau prélevée étaient versés dans un bidon neuf stérile en PEHD à travers une maille de 100µm pour éliminer le gros particulaire. Les prélèvements étaient conservés dans des glacières jusqu'au retour de marée au laboratoire pour filtration directe ou dans les 24h.

b- Filtrations séquentielles de l'échantillon d'eau au laboratoire : -Pour collecter les ADN des micro-organismes de l'échantillon: en conditions stériles, les 4 litres d'eau étaient filtrés une première fois sur filtres polycarbonate Nuclepore Ø 47mm de 8 µm (Ech. A), puis à nouveau sur filtres 0.2µm (Ech. B) (Fig. 4). Pour chaque porosité, les filtres étaient 'poolés' et congelés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. L'ensemble des deux pools servirait à constituer l'échantillon d'ADNe du prélèvement.

c- Extraction de l'ADN environnemental à partir des filtres : - Afin d'optimiser cette étape cruciale pour l'amplification des ADN par PCR, nous avons mené des essais comparés à partir de protocoles publiés (Bostrom et al., 2004, Urakawa et al., 2010, Alvez Junior et al., 2015, Sassoubre et al., 2015). Un protocole amélioré, basé l'utilisation du kit Qiagen Mobio PowerWater® DNA isolation a été retenu.

d- Amplification des gènes marqueurs par PCR : - Pour explorer la diversité bactérienne, le gène ARNr 16S a été retenu, avec des amorces ciblant la région V3-V4, spécifique des procaryotes. Pour le compartiment eucaryote, il a été retenu de cibler la région V4 du gène ARNr 18S (Guillou L., pers. com., 2015, Stoeck et al., 2010, Pawlowski, 2012, Massana et al., 2015). Ce choix permet d'avoir une séquence plus résolutive et plus de références dans les banques de séquences dédiées au plancton (Guillou et al., 2013). Les conditions de PCR pour les deux gènes cibles ont été optimisées avec la Phusion® DNA polymérase. Les amorces intégraient les adaptateurs P5 et P7 préconisés pour le séquençage MiSeq. Illumina.

e- Séquençage des bibliothèques 16S et 18S : - Le séquençage des amplicons (16S: 460pb, 18S: 410pb) a été réalisé sur un système MiSeq® Illumina à la plateforme de séquençage du GenoToul (Get-PlaGe, INRA, Toulouse) avec des runs de séquençage paired-end (2 x 250bp avec un kit 2 x 300bp-cycles et kit chimie V3 MiSeq®).

f- Traitement bioinformatique: L'ensemble des données de séquençage (fastq) ont été bancarisées dans l'espace sécurisé DATAREF par la cellule Bioinformatique de l'Ifremer. Des traitements préliminaires des séquences ont été initiés via la plateforme Galaxy et les Workflows Qiime (ex: Fig.5) et FROGS (ex: Fig.6) pour obtenir des jeux de données sous forme d'unités taxonomiques opérationnelles (OTU, engl.) permettant d'aborder la diversité génétique des communautés.

Conclusions et perspectives :

L'approche de métabarcoding 16S et 18S appliquée à l'exploration de la diversité de l'ADN environnemental et les méthodes et protocoles validés au cours du projet MORBLEU devraient permettre à terme de mieux décrire l'environnement biotique des moules dans les écosystèmes estuariens. Les données générées relatives aux taxons ou espèces présentes dans nos échantillons ainsi que leur dynamique, leur abondance relative et les indices de diversité associés aideront aussi à mieux comprendre les interactions biotiques au sein des communautés microbiennes marines.

Remerciements : Les travaux réalisés ont bénéficié du soutien financier de la Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture (Conventions DPMA-Ifremer 2015-2018). Direction des Phares & Balises de la Rochelle, SNSM de Noirmoutier (moyens à la mer).

Summary: Since 2014 in France, in Charente maritime and Vendée, farmed and stocks of blue mussels have experienced strong mortality events. In this context, the « MORBLEU » research project (DPMA-Ifremer agreement) was initiated to explore potentially aggravating factors, associated or correlated with mortality of mussels. Here, the work is to study biotic factors in mussels environment, looking for describe diversity and evolution of microbial communities (water column) before, during and after mortality events using NGS technology (metabarcoding) for environmental DNA analysis. We present, sampling strategy, Material & Methods and some preliminary results. The study is under way...

Références :

(1) Béchemin et al. (2014). Surt mortalités de la moule bleue *Mytilus edulis* dans les Pertuis Charentais (mars 2014). Rapp. Exp. (2) Béchemin et al. (2015). Épisodes de mortalité massive de moules observés en 2014 dans les Pertuis Charentais. Bull. Epid. Santé Anim. Alim. 67, 6-9. (3) Robert S. et al. (2015). Réseau national d'observation de la moule bleue *Mytilus edulis*, MYTLOBS / Campagne 2014. (4) Travers et al. (2016). Mortalités de moules bleues dans les Pertuis Charentais: description et facteurs liés - MORBLEU. (5) Pépin et al. (2017). Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens : description et facteurs liés - MORBLEU-2016.

Contact : Jean François Pépin, LER-PC- La Tremblade. jfpepin@ifremer.fr

Contributeurs : Derrien Annick, Génauzeau Sylvie, Manach Soizig, Retho Mickaël, Chevê Julien, Leroy Laura, Quintric Laure, Hervio-Heath Dominique