

Résumé :

La biodiversité est en déclin depuis un demi-siècle ceci est particulièrement dû à l'accroissement de l'urbanisation qui a pour conséquence de diminuer la naturalité et la richesse faunistique /floristique en milieu urbain. Cependant, parmi la biodiversité restante en ville il existe une biodiversité adverse pour les citoyens et les gestionnaires urbains. On peut citer les moustiques, les rats, l'ambrosie. Qui sont de véritables freins au re-développement de la biodiversité en ville par les nuisances qu'ils induisent.

Les techniques de gestion alternative des eaux pluviales en zone urbaine sont parfois suspectées de contribuer au développement de moustiques qui constituent une véritable gêne, voire des risques potentiels pour les riverains.

En effet les moustiques urbains ont généralement besoin de 7 à 12 jours pour se développer dans des eaux stagnantes. Les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales (objet technique suivi au sein de l'observatoire) doivent se vidanger en moins de 24h cependant suite à une mauvaise conception ou une mauvaise gestion celles-ci peuvent maintenir des eaux stagnantes pendant plusieurs jours. Il est donc important de connaître les espèces pouvant se développer pour mieux les gérer.

Une solution classique pour identifier les moustiques est l'identification morphologique, il existe cependant une solution alternative : l'identification moléculaire. Cette fiche présente les 4 principales étapes de cette identification moléculaire: (1) Extraction d'ADN ; (2) Amplification de l'ADN par PCR. (3) Séquençage Sanger ; (4) identification moléculaire.

■ Cadre Général :

Lorsque l'on parle de gestion de l'eau en milieu urbain, 4 objectifs sont fortement présents :

- limiter les risques d'inondation,
- limiter les risques de pollution,
- intégrer la gestion des eaux pluviales dans l'aménagement,
- et enfin de protéger le milieu naturel.

Pour répondre à ces objectifs, il n'y a pas de solution unique.

La gestion de l'eau doit s'adapter à chaque situation et mixer les techniques classiques d'assainissement (réseau unitaire + step) et les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales.

Les techniques alternatives de gestion des eaux pluviales, sont des techniques qui redonnent pleinement aux surfaces leur rôle régulateur.

Les eaux pluviales sont ainsi stockées et/ou drainées jusqu'à des ouvrages de rétention (bassin de rétention) et/ou d'infiltration (bassin d'infiltration ou techniques de gestion à la source (noue, tranchée, jardin de pluie, parking poreux ...).

Les ouvrages alternatifs de gestion des eaux pluviales introduisent notamment par leur caractère végétalisé de la biodiversité à l'intérieur de la ville et sont parfois suspectés de constituer des gîtes pour ces nouveaux vecteurs, tels que les moustiques.

Les moustiques peuvent avoir des conséquences sanitaires impactantes et en particulier le moustique tigre (*Aedes albopictus*) . Mieux connaître les communautés de *Culicidés* (moustiques), les individus au rang de l'espèce permettent de mieux gérer cette population et les nuisances éventuelle qu'elle induit.

■ Objectifs :

L'identification morphologique est difficile dans le cas de larves ou d'adultes endommagés. De plus, l'identification morphologique chez les nymphes est impossible. Il est donc intéressant de recourir à une méthode moléculaire.

L'identification moléculaire peut être réalisée sur des individus préservés dans l'alcool ou préservé à sec. L'identification est possible grâce à l'amplification d'un gène universel : le gène COI (cytochrome oxydase sous-unité 1). Les bases de données publiques (NCBI, BOLD) recensent la plupart des séquences du gène de la COI des espèces de moustiques présentent en Rhône-Alpes.

■ Contacts :

Auteur principal : Lucille MACHICOANE, Master BEE, Université Lyon 1.

Lara KONECNY, Email: lara.konecny@univ-lyon1.fr | Tristan LEFEBURE, Email : tristan.lefebure@univ-lyon1.fr | Pierre MARMONIER, Email : pierre.marmonier@univ-lyon1.fr
UMR-CNRS 5023 LEHNA, Equipe Ecologie, Evolution, Ecosystèmes Souterrains, Université Claude Bernard Lyon 1. 69622 Villeurbanne.

■ Méthodologie de prélèvements :

Les principales étapes pour réaliser l'identification moléculaire sont :

- (1) Extraire l'ADN,
- (2) Amplifier par PCR (réaction en chaîne par polymérase) à l'aide d'amorce universel du gène du COI.
- (3) Après amplification de l'ADN, celui-ci peut être envoyé au séquençage.
- (4) La séquence d'ADN du gène COI est analysée dans Blast (Basic Local Alignment Search Tool) afin de retrouver les séquences dans les bases de données. Le reste des échantillons doivent être conservés à -18°C.

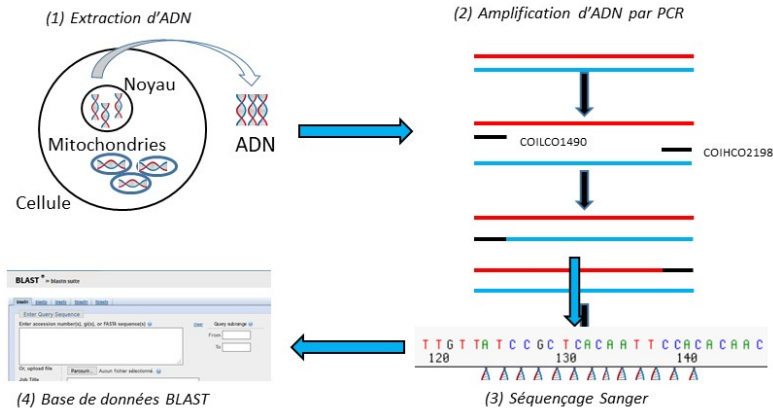
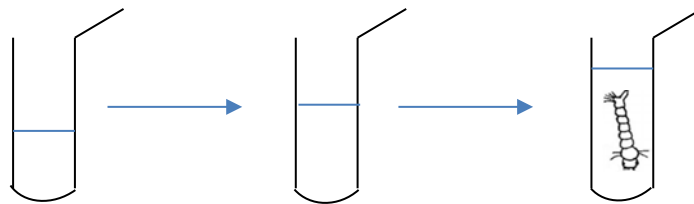


Figure 1- Principales étapes de l'identification moléculaire.

Etape 1 : L'extraction de l'ADN est effectuée grâce à une solution de Chelex®. Dans des microtubes PCR de 0.2ml, 150 µl de Chelex® 7% (solution sous agitation lors du pipetage) et 10 µl de protéinase K (15mg/ml) sont ajoutés à chaque échantillon biologique (animal entier ou fragment). Entre 2 échantillons la pince est plongée dans l'alcool et flambée pour éviter les contaminations.

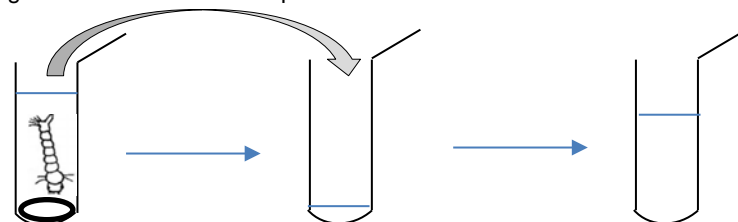
Les échantillons sont ensuite incubés 2h à 56°C puis 15min à 90°C dans un thermocycleur.



150µl de Chelex®7% + 10µl de protéinase K + échantillon biologique

Figure 2- Extraction ADN au Chelex.

Etape 2 : Une fois l'ADN extrait, celui-ci est centrifugé pour séparer les éléments et récupérer le Chelex® dans le culot des microtubes. L'ADN récolté est dilué au 1/30^{ème}. Dans des microtubes PCR de 0.2ml, 150 µl d'eau sont ajoutés à 5µl d'ADN. L'ADN dilué est placé au frigo en attendant d'être amplifié.



Culoter le Chelex -> prélever 5 µL d'ADN en surface + 150µl d'eau pure

Figure 3- Dilution de l'ADN au 1/30^{ème}

Etape 3 : L'ADN dilué est ensuite amplifié par PCR. Un mix PCR est préparé en fonction du nombre d'échantillons et en prenant en compte un témoin négatif sans ADN (Tableau 1). Le mix PCR est constitué de primers universels du COI : COILCO1490 (séquence : GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) et COIHCO2198 (séquence : TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA, Folmer et al., 1994). Une fois le mix réalisé, 23µl de celui-ci sont répartis dans des microtubes et 2µl d'ADN dilué au 1/30^{ème} sont ajoutés. Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur avec le programme PCR de la figure 4.

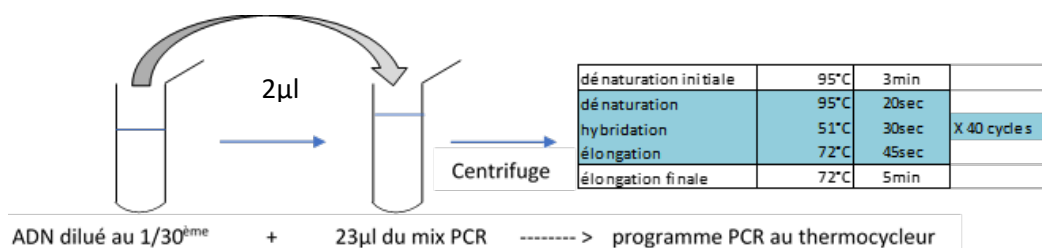


Figure 4- Ajout de l'ADN au mix PCR et programme dans le thermocycleur.

Tableau 1- Composition du mix PCR.

PCR COI	25,0µl vol final		
	µl pour 1 éch	C final	µl pr n = 46,0
H2O	17,00		782,00
standard Buffer 10X with 30mM MgCl2 EURO BIO	2,50	1,00X	115,00
10µM primer COILCO1490	1,00	0,40µM	46,00
10µM primer COIHCO2198	1,00	0,40µM	46,00
BSA 100X (10mg/ml Biolabs B9000S)	0,25	0,10mg/ml	11,50
dNTP 5mM each (Eurobio GAEP CR11-5D)	1,00	0,80mM	46,00
EUROBIOTAQ DNA pol 5U/µl (GAETAQ00-4D)	0,25	0,05U/µl	11,50
Répartir le mix dans les tubes PCR			
ADN chelex dilué	2		

Etape 4 : Préparation d'un gel d'agarose de 1.3% (3.9g d'agarose ajouté à 300 ml de TAE 1X). Sur le gel est déposé : pour chaque échantillon 5µl du produit PCR mélangé à 1µl de Gel Red (intercalant de l'ADN contenant 30% glycerol, 0.3% bleu de Bromophenol et 0.4% GelRed) ; le blanc de PCR (mélangé à 1µl de Gel Red) ; 0.6µl de marqueur de taille au début de chaque ligne. La migration de l'électrophorèse a lieu pendant 30 minutes. Le gel est ensuite observé grâce aux lumières UV.

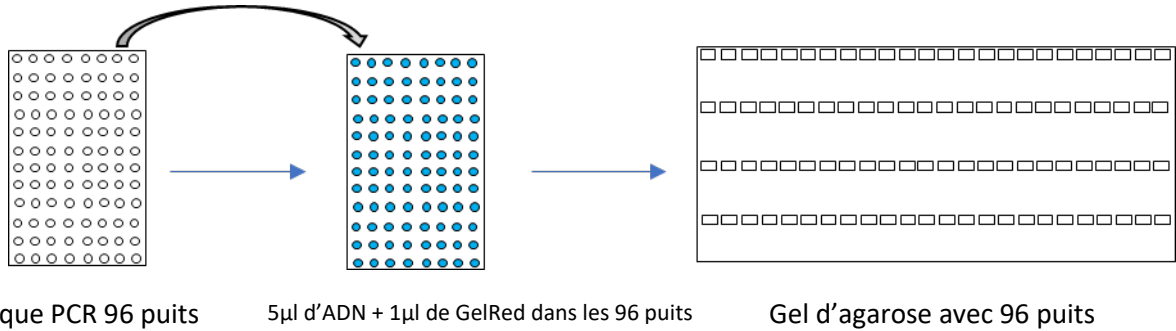


Figure 5- Dépôt de la PCR sur gel d'agarose

Etape 5 (si besoin) : En cas de non réussite de l'amplification d'ADN une PCR semi nichée est possible. Pour cela il suffit de réaliser un mix PCR avec les amorces suivantes : COIHCO2198 (TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) et COILMF1 (cette amorce a été créée durant l'étude : TTTTGGTGCTTGAGCWGGAATAG). Puis d'ajouter 1µl de la PCR précédente à 24µl du nouveau mix. Les tubes sont placés dans un thermocycleur avec le même programme que pour la PCR classique.

Figure 6- Ajout du produit PCR au mix de la PCR semi nichée et thermocycleur

PCR COI	25,0µl vol final		
	µl pour 1 éch	C final	µl pr n = 84,0
H2O	18,00		1512,00
standard Buffer 10X with 30mM MgCl2 EURO BIO	2,50	1,00X	210,00
10µM primer COILMF1	1,00	0,40µM	84,00
10µM primer COIHCO2198	1,00	0,40µM	84,00
BSA 100X (10mg/ml Biolabs B9000S)	0,25	0,10mg/ml	21,00
dNTP 5mM each (Eurobio GAEP CR11-5D)	1,00	0,80mM	84,00
EUROBIOTAQ DNA pol 5U/µl (GAETAQ00-4D)	0,25	0,05U/µl	21,00
Répartir le mix dans les tubes PCR			
Produit de la 1ère PCR	1		

PCR précédente + 24µl du mix PCR

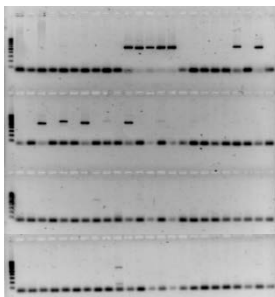


Image 1 : Résultat de l'électrophorèse sur une PCR

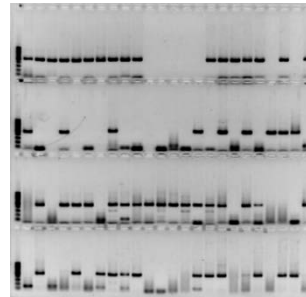


Image 2 : Résultat de l'électrophorèse sur une PCR semi nichée

Etape 6 : L'ADN ayant été bien amplifié par PCR (classique ou semi niché) sont ensuite envoyés à un centre de séquençage. Les séquences d'ADN des échantillons biologiques sont ensuite récupérées via FinchTV et peuvent être alignées dans Seaview avec des séquences de référence de différentes espèces de moustiques.

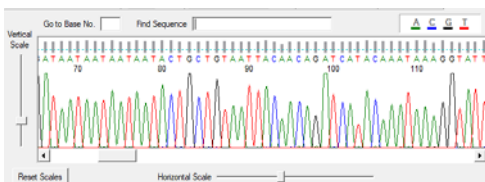


Image 3 : Morceau de séquence d'ADN sur FinchTV

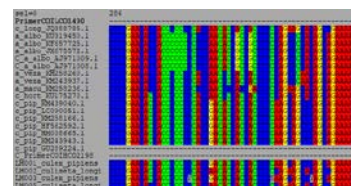


Image 4 : Alignement de différentes séquences du gène du COI d'échantillons biologiques avec plusieurs espèces de moustiques de références.

Étape 7 : Les séquences d'ADN du gène du COI des échantillons biologiques récupérées sont analysés au niveau moléculaire par le site BLAST. La séquence est déposée puis les espèces correspondant le mieux à la séquence s'affichent. Le % d'identité (Ident) doit être d'au moins 98% pour être fiable.

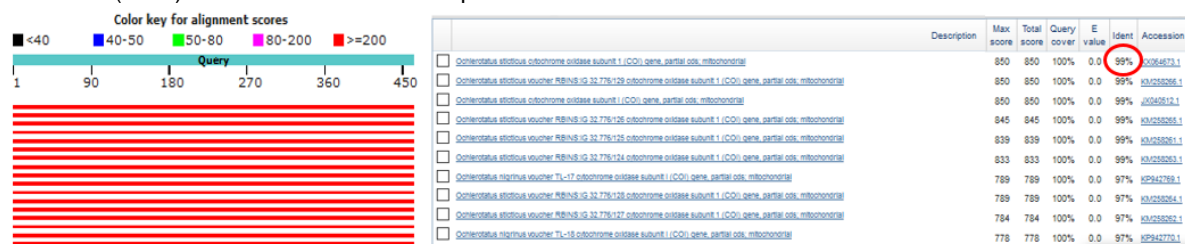


Image 5 : Exemple de résultats dans Blast.

Exemple d'utilisation :

Pour mieux comprendre l'origine et la diversité des peuplements de moustiques urbains, on souhaite comparer la liste des espèces trouvées dans des bassins d'infiltration (milieu fortement anthropisé) avec les espèces présentes dans des systèmes d'aspect naturels (présence de végétation, eau plus permanente) et des milieux naturels (en zone alluviale, hors agglomération). L'outil moléculaire permet de lister l'ensemble des espèces présentes, y compris celles alors en phase nymphale. Les bassins de rétention, lorsqu'ils retiennent un peu d'eau, hébergent quelques espèces de moustiques seulement (5 au total contre 12 dans les zones humides naturelles), mais ces espèces se nourrissent, pour la plupart d'entre elles, de sang humain. Il convient donc d'optimiser la gestion de ces bassins en limitant drastiquement la durée de la rétention d'eau.

Tableau 2- Espèces de moustiques trouvées dans 11 zones humides naturelles, 9 systèmes aquatiques urbains d'aspect naturels et 9 bassins d'infiltration d'eau pluviale (4 dates d'avril à juillet 2018)

espèces	milieux naturels	milieux anthropique	
		aspect naturel	BI / Rétention
<i>Culex pipiens</i>	X	X	X
<i>Culex modestus</i>			X
<i>Culex territans</i>	X	X	
<i>Culex impudicus</i>	X		
<i>Anopheles claviger</i>	X		X
<i>Anopheles maculipenni</i>	X	X	X
<i>Anopheles messae</i>	X	X	X
<i>Aedes cinereus</i>	X	X	
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>	X	X	
<i>Ochlerotatus annulipes</i>	X		
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	X		
<i>Ochlerotatus cantans</i>	X		
<i>Ochlerotatus rusticus</i>	X		
<i>Coquilletidia richardii</i>		X	

En termes de gestion, le gestionnaire de ces ouvrages pourrait prioriser ces interventions de curage et entretien par exemple sur les sites présentant plusieurs espèces de moustiques en quantité significative.

Cette analyse moléculaire n'est pas actuellement une analyse courante réalisée par les laboratoires, mais pourrait dans un avenir proche se développer et être accessibles aux acteurs opérationnels. Ces suivis seraient alors de bons indicateurs de gestion de ces ouvrages.

Bibliographie :

| SYNTHÈSE OTHU N°1 | Les Moustiques dans les ouvrages de gestion alternative des eaux pluviales en ville ? | retour sur l'étude exploratoire 2016 | Exemple des bassins d'infiltration et rétention de la Métropole de Lyon, SEPTEMBRE 2017, 8 pages.

M. Valdelfener, S. Barraud, E. Sibeud, L. Bacot, Y. Perrin, F. Jourdain & P. Marmonier, « Do Sustainable Drainage Systems favour mosquito proliferation in cities compared to stormwater networks? » October 2018, Urban Water Journal, DOI: 10.1080/1573062X.2018.1523442

M. Valdelfener, E. Sibeud, L. Bacot, G. Besnard, Y. Rozier, S. Barraud, P. Marmonier « Développement de peuplements de moustiques (Diptera, Culicidae) dans des ouvrages de techniques alternatives de gestion des eaux pluviales - Exemple de la Métropole de Lyon », April 2018, Techniques - Sciences - Methodes, DOI: 10.1051/tsm/201804055