

Technique

La génétique nouvelle génération : état des lieux de la mise en œuvre d'une nouvelle méthode

La routine éprouvée

Depuis 2001, le suivi indiciaire de la population de loups repose sur la combinaison de diverses approches méthodologiques et outils, et notamment l'outil biomoléculaire, essentiel pour comprendre l'organisation et la composition en animaux des différentes meutes de loup. Ainsi, au cours du temps on pourra distinguer différentes phases de diagnostic: le maillage des indices de présence hivernaux, couplé avec la distribution des attaques sur un territoire permet de "cibler" un nouveau groupe en phase d'installation. Les prospections par hurlements provoqués viennent compléter la connaissance en statuant (ou non) sur la présence d'un groupe en tant que tel, et sur la distinction des groupes voisins entre eux à un instant donné. Cependant l'emprise territoriale occupée a minima par les animaux de la meute ne peut pas être évaluée via le suivi indiciaire classique. Cette connaissance requiert l'identification individuelle des animaux. Les outils moléculaires, en plein essor au début des années 2000, ont naturellement trouvé leur application sur le loup en permettant d'accéder à la « carte d'identité génétique » des individus au travers de leur ADN, extrait des excréments, urines, sang, poils et autres tissus laissés sur leur passage. La collaboration avec le Laboratoire d'Ecologie Alpine de Grenoble (LECA) avait ainsi permis de développer un panel de 7 marqueurs génétiques (dit microsattellites) permettant de différencier les individus entre eux avec une probabilité de moins de 1/1000 de confondre deux animaux non apparentés et 1/200 de confondre deux animaux apparentés. Le système d'analyse, une fois rodé dans le cadre d'un partenariat scientifique, a alors été contractualisé sous la forme d'un marché public depuis 2003. Ainsi chaque année, entre 400 et 600 échantillons biologiques d'ours et de loup (principalement des excréments) sont passés au crible de la génétique pour individualiser les individus détectés. Cette donnée est ensuite mise à profit pour :

- comprendre l'organisation spatiale des groupes entre eux au travers de la localisation géographique des animaux qui les composent
- identifier certains mouvements de dispersions parfois à longue distance

- utiliser des modèles dits de « Marquage-Recapture (ici les empreintes génétiques issus des typages) efficaces pour estimer les risques statistiques de « rater » un animal et ainsi en déduire les effectifs totaux de la population.

Rester à la pointe de la technologie : une obligation de rigueur

Les techniques bio-moléculaires évoluent à grande vitesse et avec elle leur degré de résolution qui ne cesse de s'affiner. Outre la révolution des outils PCR (permettant de répliquer l'Adn à l'infini en de multiples copies et ainsi de travailler sur l'Adn dit « rare » trouvé en faible quantité ou partiellement dégradé), les



Les excréments ; source d'ADN la plus représentée dans les analyses génétiques - Photo : Y. Leonard ©

machines de séquençage passent aujourd'hui à l'ère du séquençage massif ! En d'autres termes, après les petites machines intra-laboratoires (de plusieurs centaines de milliers d'Euro tout de même) limitées en puissance et en capacité d'absorption des volumes, l'avenir se tourne aujourd'hui vers les Séquenceurs Nouvelle Génération (NGS) capables d'absorber plusieurs milliers d'échantillons par semaine mais aussi et surtout, une lecture directe de l'ADN à la mutation près ! Rester au goût du jour dans le développement applicable à nos espèces d'intérêt est incontournable dans la mesure où les anciennes machines sont amenées à ne plus être maintenues en service, pour cause de rentabilité nécessaire insuffisante à leur utilisation. Le LECA a donc pris les devants pour développer dans sa composante

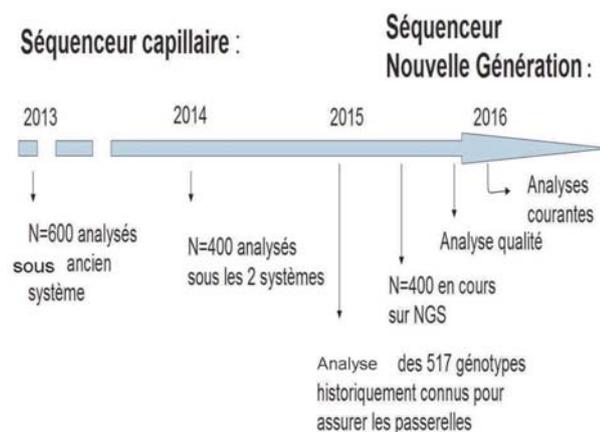
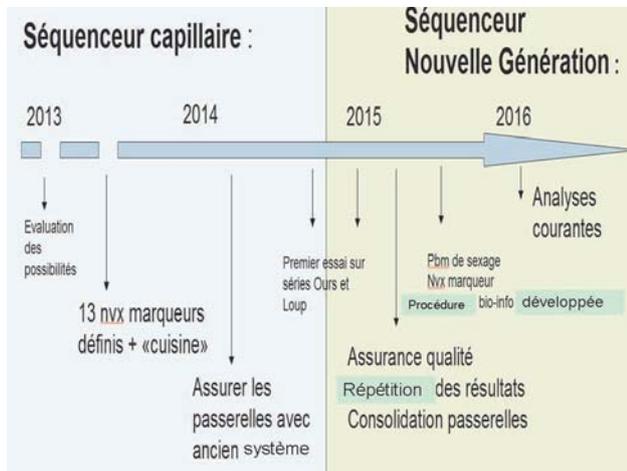


Figure 1 : les étapes de l'étude scientifique et de la mise en place du nouveau protocole de typage ADN des ours et des loups

"Recherche CNRS" cette nouvelle machinerie obligeant du même coup à refondre entièrement les procédures depuis le choix des nouveaux marqueurs jusqu'à l'assurance qualité de la continuité (« passerelles ») des résultats déjà obtenus sur les ours et les loups avec l'ancien système.

Avantages et inconvénients

Les séquenceurs jusqu'ici utilisés reposaient sur le principe de mesure des longueurs des séquences ADN recherchées dans le génome, une moitié provenant de la mère et l'autre moitié du père : plus l'ADN est court, plus il migre sur le capillaire. Son identification se mesurait donc en nombre de paire de bases (les allèles) pour chaque marqueur recherché et ainsi établir le profil individuel de l'animal sur la base des 7 fragments

inspectés.

L'avantage de la méthode résidait dans sa faisabilité en local mais posait des contraintes de temps de réalisation et de volume limité d'analyses possibles. L'inconvénient majeur était surtout l'impossibilité de comparer des profils réalisés par des séquenceurs différents, puisque les résultats sont dépendants du réglage de chaque appareil. Seuls des procédures longues, fastidieuses et coûteuses de calibrage entre les différents matériels (que nous avons tentées dans le cadre du Groupe Loup Alpin) permettent ces comparaisons, mais sont difficiles à maintenir dans le temps pour tenir compte de la diversité génétique des populations scannées (Franco-Italo Suisse). Seule donc une comparaison relative par superposition d'un profil sur un autre permet de savoir si l'échantillon scanné présente le même profil qu'un animal déjà connu dans nos bases de données françaises. Le NGS répond à ce problème à la fois de quantité, mais aussi de résolution dans la mesure où les fragments ADN recherché sont « lus » intégralement de façon individuelle et directe : on lit la séquence génétique base par base, et non par le nombre de répétition du motif constituant le fragment. Cette lecture direct permet ainsi de s'affranchir d'une comparaison relative et affine également le niveau de lecture « à la mutation près » du profil génétique de l'animal. Ces séquenceurs ne sont en revanche disponibles que dans quelques structures complètement dédiées à leur utilisation, et ne fonctionnent qu'avec des quantités importantes d'échantillons analysés en même temps (le coût de séquençage facturé étant le même, qu'un seul échantillon ou 100 soient analysés), nécessitant le regroupement des échantillons. Cette procédure n'autorisera donc plus les analyses « en urgence » avec retour sous 15 jours ni en petites quantités, des demandes qui devront passer par d'autres prestataires déjà identifiés, et à la charge du demandeur. En contrepartie la technique NGS permet une réduction substantielle des coûts par échantillon grâce à l'automatisation qui, sous réserve d'un budget équivalent disponible, permettrait d'analyser 1, 5 plus d'échantillons à l'année qu'auparavant. Cette automatisation de traitement nécessite en plus une forme de calibrage de la lecture des résultats par traitement de l'information en bio-informatique. Ainsi de nombreux ajustement des programmes utilisés ont été requis pour optimiser la qualité des résultats durant les premières sessions testées en 2015 dont bon nombre ont du faire l'objet d'une séance de rattrapage !

Technique

Le prix à payer : les délais de la mise en place en 2015 pour un retour à la normale début 2016

L'année 2015 a donc été largement consacrée à développer et tester ce nouvel outil, engendrant du même coup les (trop) longs retards dans l'exercice courant d'analyses génétiques sur les échantillons du Réseau. Le prix à payer, sachant que nous nous sommes efforcés de tenir les objectifs à minima pour ne pas bloquer le processus d'analyses courantes. Ainsi en 2015, malgré les retards, près de 400 échantillons ont été analysés. Les premiers passages sous le nouveau procédé ont été mis en œuvre à partir de septembre 2015, et les résultats figurent dans les listings en fin de Bulletin.

Cette mise en place est aujourd'hui quasiment achevée et nous avons convenu avec le LECA d'un rythme de croisière de 80 échantillons (loup + ours) par mois applicable dès ce mois de janvier avec résultats sous 2 mois. Gageons que ce pari sur l'avenir permette de gagner en flexibilité et permette aussi que le nombre d'analyses effectuées soit à la hauteur des enjeux et de vos attentes.

Christophe Duchamp

Séquenceur capillaire :

- 
- Migration des µsat selon leur poids
 - Comparaison de profils relativement à un autre
 - Interprétation difficile des « faibles » signaux (expérimentateur-dépendant)
 - Beaucoup de main d'œuvre
 - Faisable en local (Grenoble)
 - 200 échantillons en 2 mois (de l'extraction à l'interprétation des profils) pour 2 techniciens

Séquenceur Nouvelle Génération :

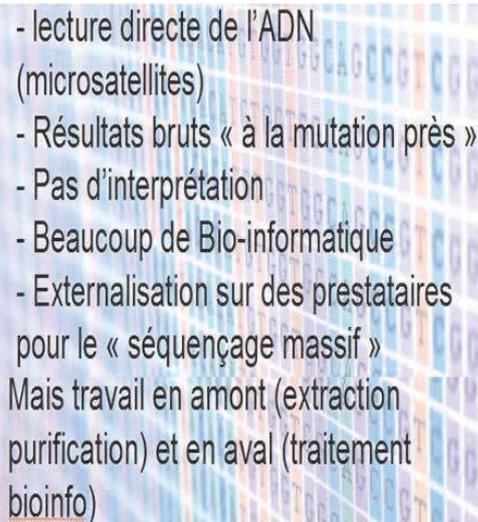
- 
- lecture directe de l'ADN (microsatellites)
 - Résultats bruts « à la mutation près »
 - Pas d'interprétation
 - Beaucoup de Bio-informatique
 - Externalisation sur des prestataires pour le « séquençage massif »
- Mais travail en amont (extraction purification) et en aval (traitement bioinfo)

Figure 2 : Comparaison des avantages et inconvénients de l'ancienne technique de séquençage ADN (séquenceur capillaire) par rapport à la nouvelle méthodologie utilisant les NGS.