



L'ADN environnemental : une méthode innovante pour les inventaires de la biodiversité

Pauline JEAN

Tour du Valat le 12 juin 2013



Introduction

I. Approche spécifique (eDNA barcoding)

II. Approche multispécifique (eDNA metabarcoding)

III. Approche multigroupe

Conclusion

Qu'est ce que l'ADN environnemental (eDNA) ?

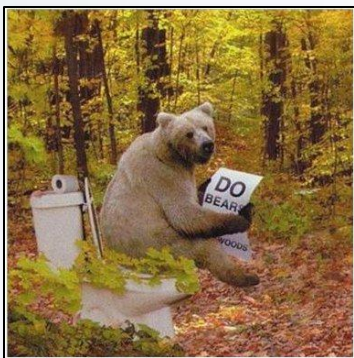
- ADN pouvant être extrait d'échantillons environnementaux (tels que le sol, l'eau ou l'air) sans avoir besoin d'isoler au préalable des individus cibles (Taberlet *et al.*, 2012)

ADN intracellulaire
+
ADN extracellulaire



Quelles sont les sources d'eDNA ?

Fèces



Poils



Sol



Eau

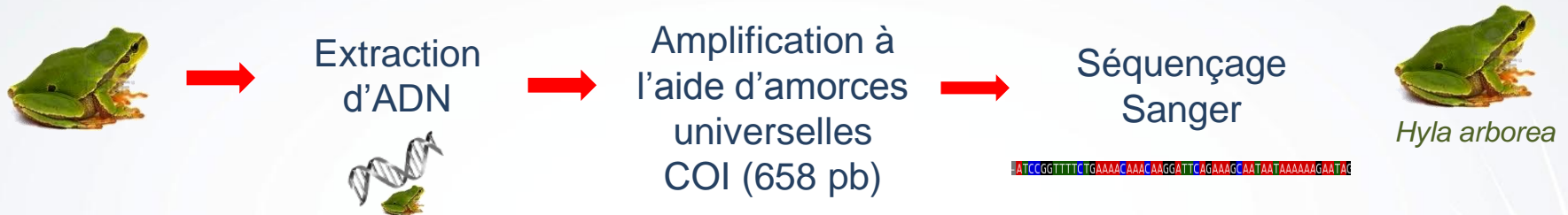


Autres sources

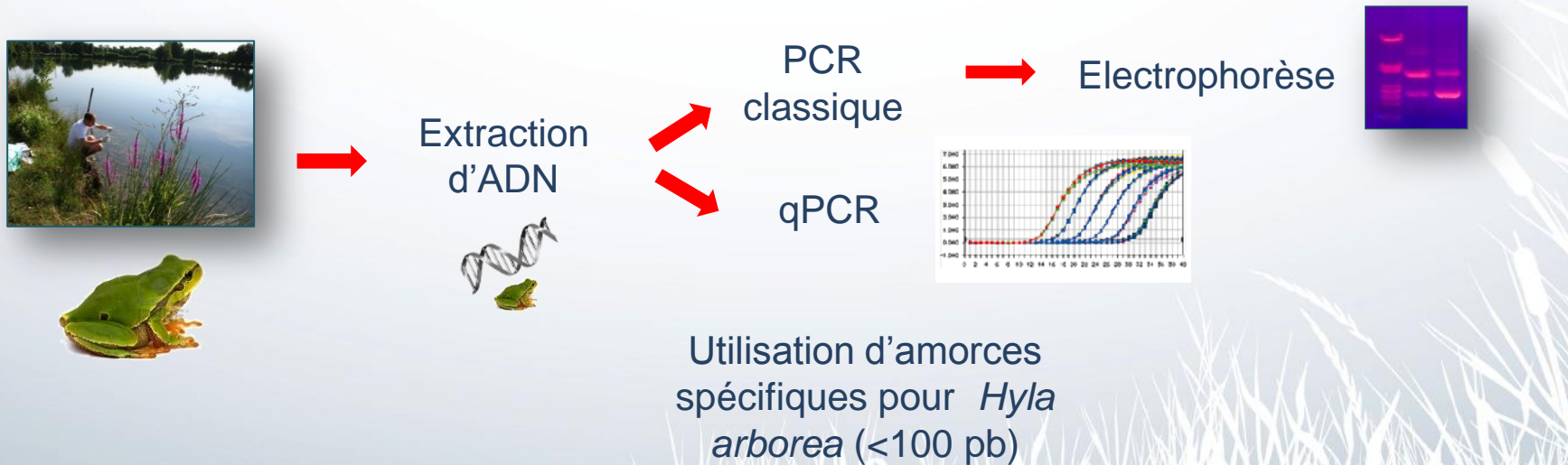


Quelles sont les différentes méthodes utilisées ?

DNA Barcoding



eDNA Barcoding



eDNA Metabarcoding



Extraction
d'ADN



Amplification en
utilisant des amorces
pour les **amphibiens**
< 100 pb



Séquençage
Nouvelle Génération

```
ATCCGGTTTCGAAACAAACAGGATTCAGAA
ATCCGCTTTCCGAAACAAACAAAAGTTCAG
ATCCCTTTTTCGAAACAAACAGGGGTTCCAA
ATCTTATGTTTGAAGAAACAGGTTTAAATTA
ATCCGTGTTTGAAGAAACAGGGGTTCCGAAC
ATCCGTGTTTGAAGAAACAGGGGTTCCGAAC
ATCCGTGTTTGAAGAAACAGGGGTTCCGAAC
ATCCCTTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCCTTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCGTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCGTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCCTTTCCTTTTCGAAACAAACAGGGGTTCC
```



Approche multigroupe



Extraction
d'ADN



Amplification en utilisant
plusieurs couples
d'amorces < 100 pb

- Amphibiens
- Odonates
- Poissons
- Mammifères



Séquençage
Nouvelle Génération

```
ATCCGGTTTCGAAACAAACAGGATTCAGAA
ATCCGCTTTCCGAAACAAACAAAAGTTCAG
ATCCCTTTTTCGAAACAAACAGGGGTTCCAA
ATCTTATGTTTGAAGAAACAGGTTTAAATTA
ATCCGTGTTTGAAGAAACAGGGGTTCCGAAC
ATCCGTGTTTGAAGAAACAGGGGTTCCGAAC
ATCCGTGTTTGAAGAAACAGGGGTTCCGAAC
ATCCCTTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCCTTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCGTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCGTTTTCGAAACAAACAGGTTTCGAAC
ATCCCTTTCCTTTTCGAAACAAACAGGGGTTCC
```



I. Approche spécifique (eDNA Barcoding)







Pelobates fuscus



Emys orbicularis



Triturus cristatus



Aeshna viridis



Trichobilharzia sp.



Lithobates catesbeianus



Zingel asper



Mustela lutreola



Procambarus clarkii



Neovison vison



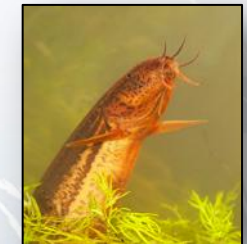
Leucorrhinia pectoralis



Arvicola sapidus



Microtus oeconomus



Misgurnus fossilis

Première étude montrant la détection d'espèces à partir de prélèvements d'eau en utilisant l'eDNA



Grenouille taureau
(*Lithobates catesbeianus*)

3 prélèvements d'eau de 15 ml sur 9 plans d'eau

Détection

- Densité forte



- Densité faible

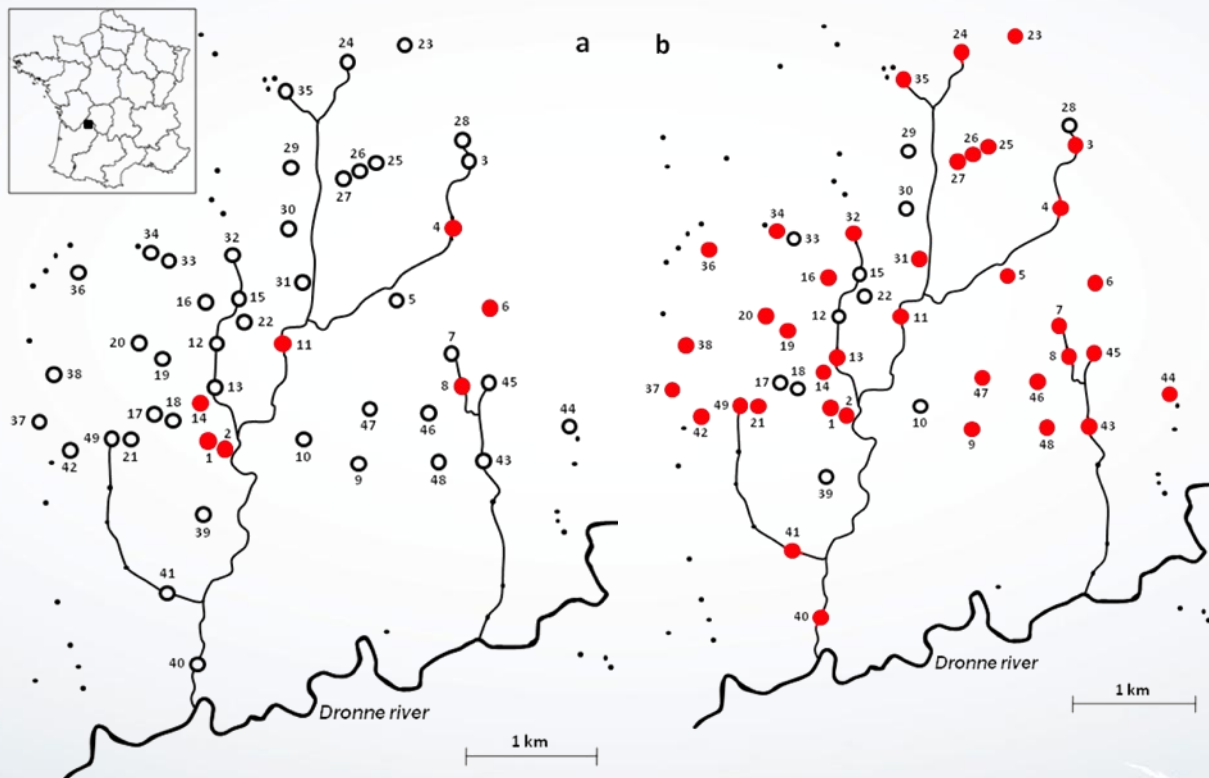


- Absence



Etude comparative pour l'inventaire de la Grenouille taureau sur 49 sites

- *Inventaire classique* : Prospections diurnes et écoutes nocturnes
- *Inventaire eDNA* : 3 prélèvements d'eau de 15 ml



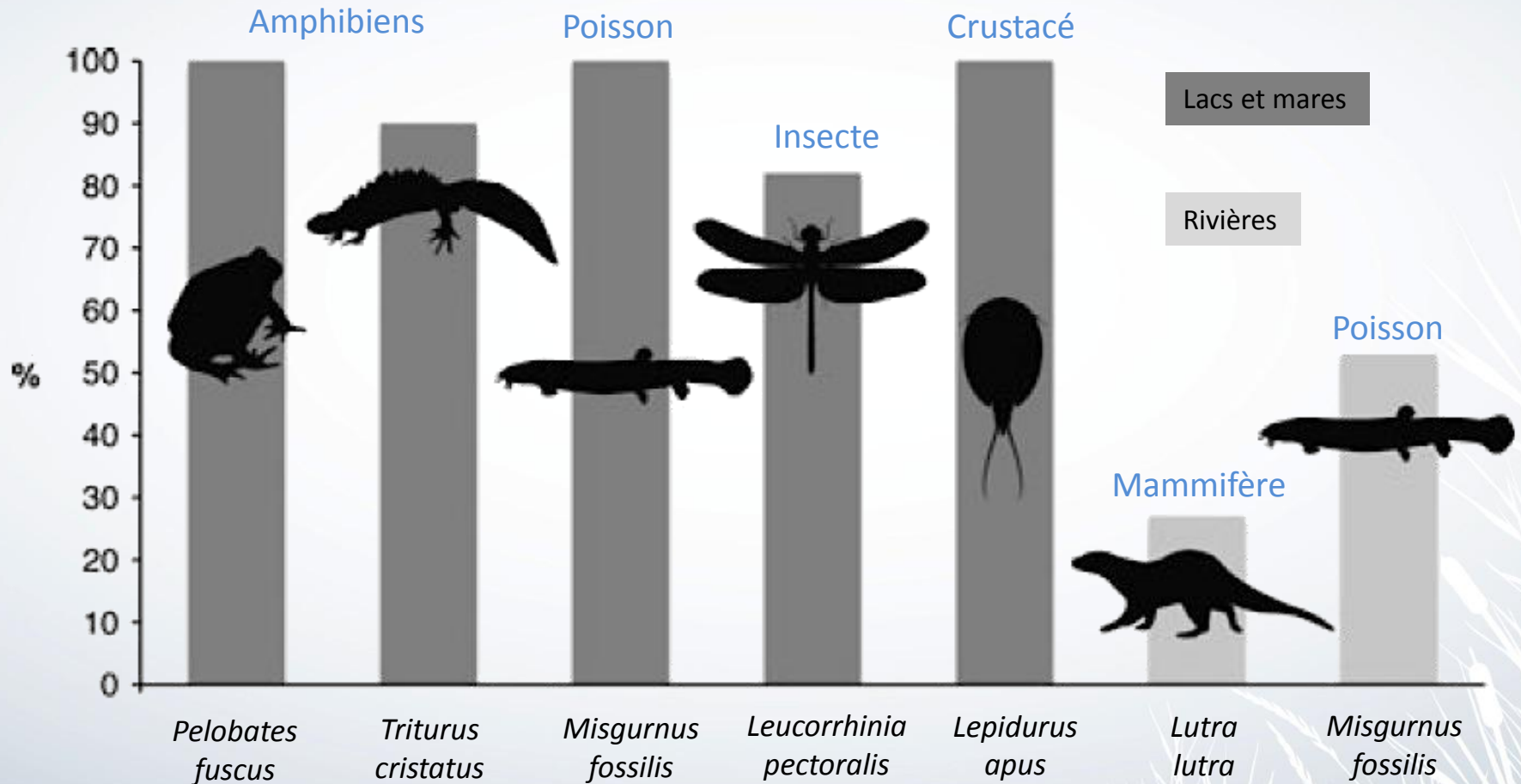
Inventaire classique :
Détection sur 7 sites



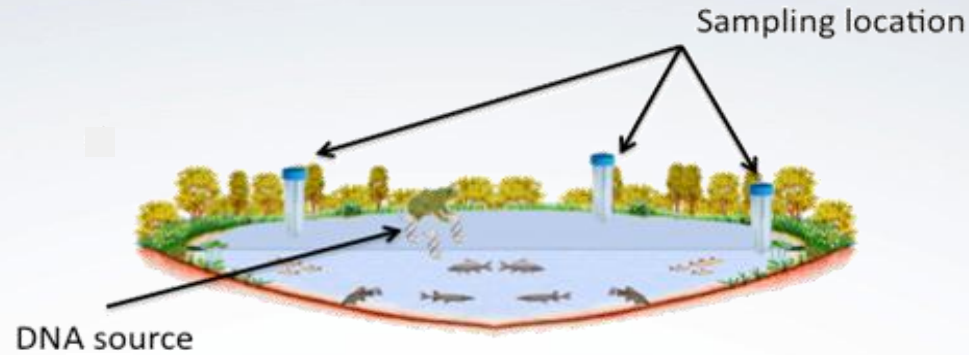
Inventaire eDNA:
Détection sur 38 sites

eDNA : 2,5 fois plus rapide sur le terrain et 2,5 fois moins couteux qu'un inventaire traditionnel

Détection d'espèces rares à l'aide d'ADN environnemental dans des milieux stagnants et courants

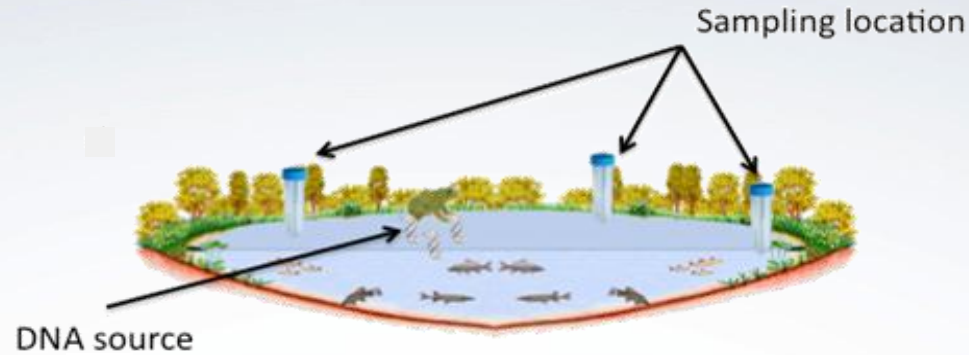


**Stratégies
d'échantillonnage :
local versus
étendu**

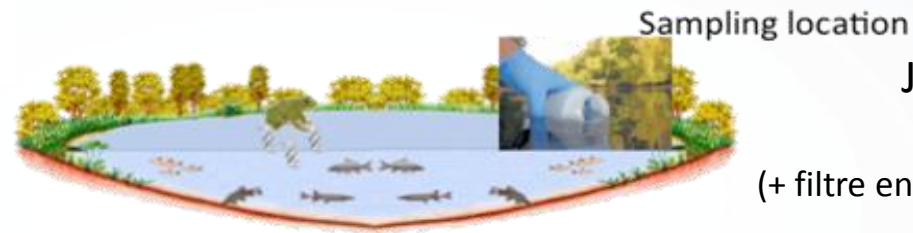


Ficetola *et al.*, 2008

Stratégies
d'échantillonnage :
local versus
étendu



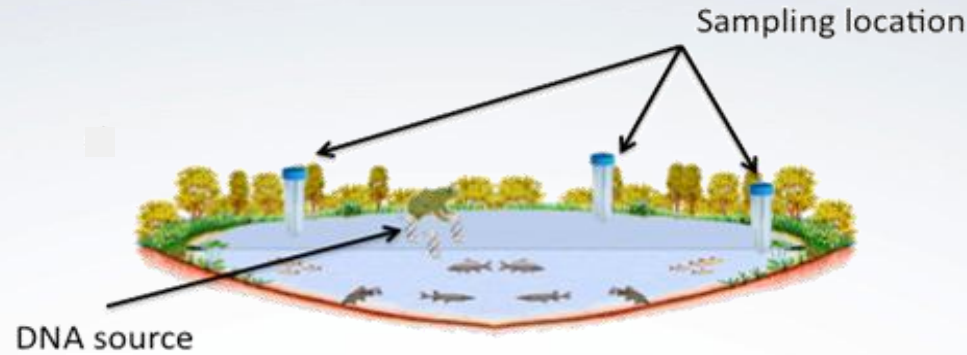
Ficetola *et al.*, 2008



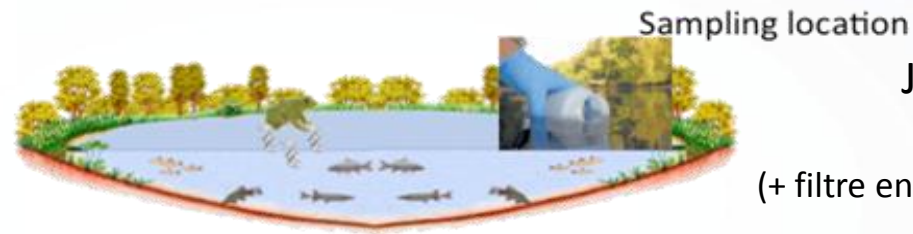
Jerde *et al.*, 2011

(+ filtre en fibres de verre)

Stratégies
d'échantillonnage :
local versus
étendu

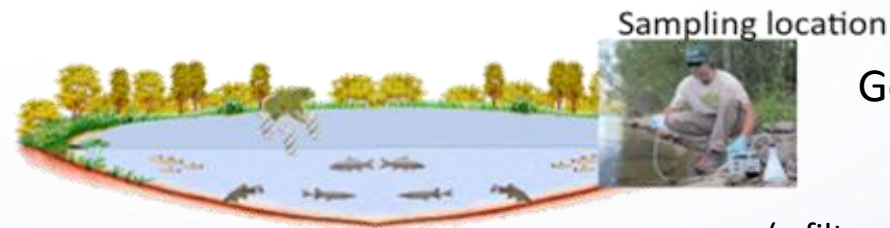


Ficetola *et al.*, 2008



Jerde *et al.*, 2011

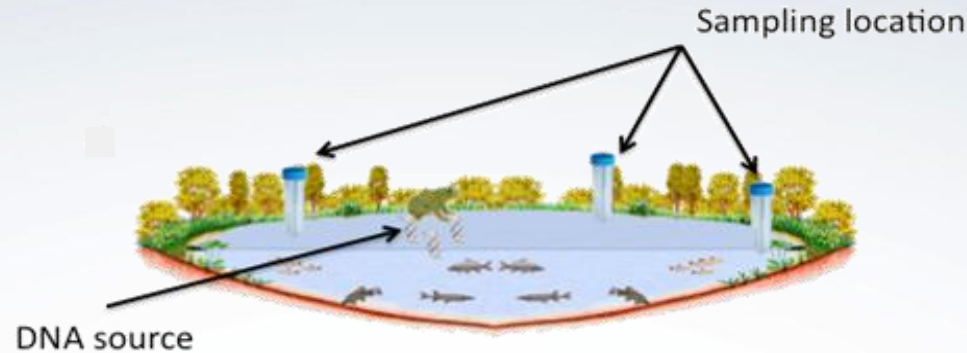
(+ filtre en fibres de verre)



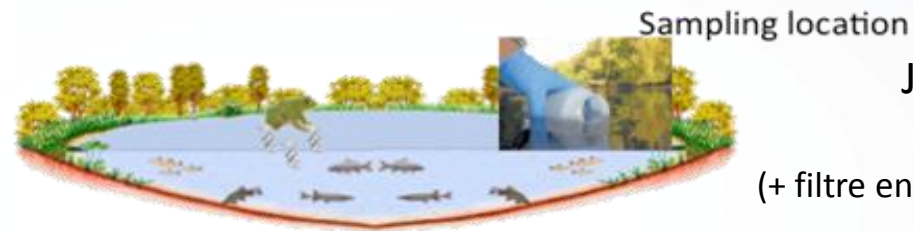
Goldberg *et al.*, 2011

(+ filtre en nitrate de cellulose)

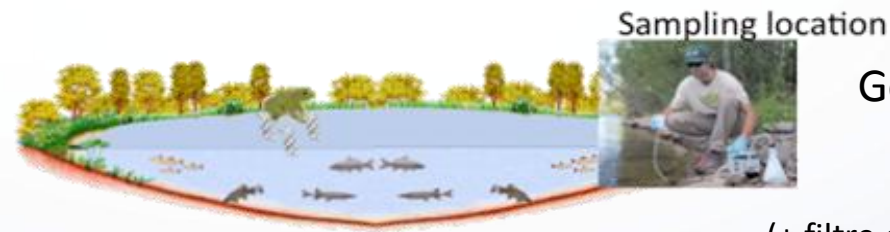
Stratégies
d'échantillonnage :
local versus
étendu



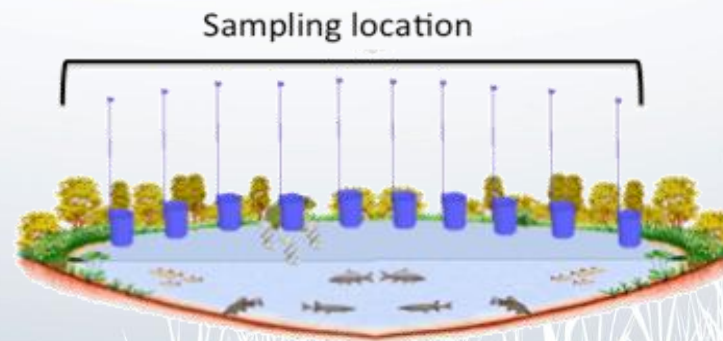
Ficetola *et al.*, 2008



Jerde *et al.*, 2011

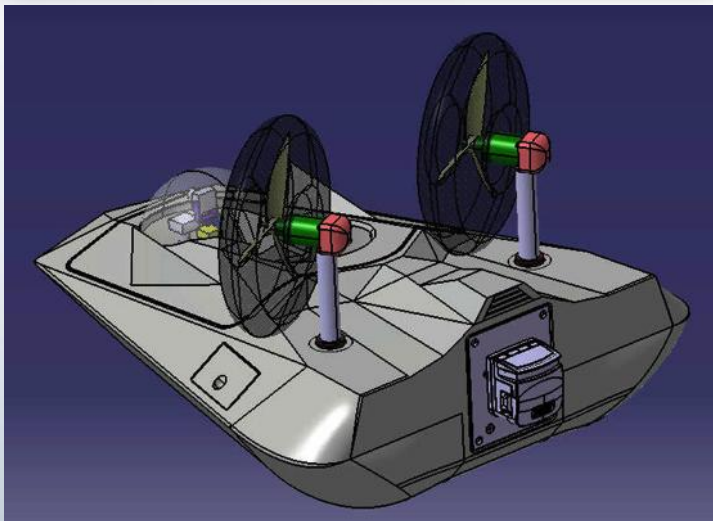
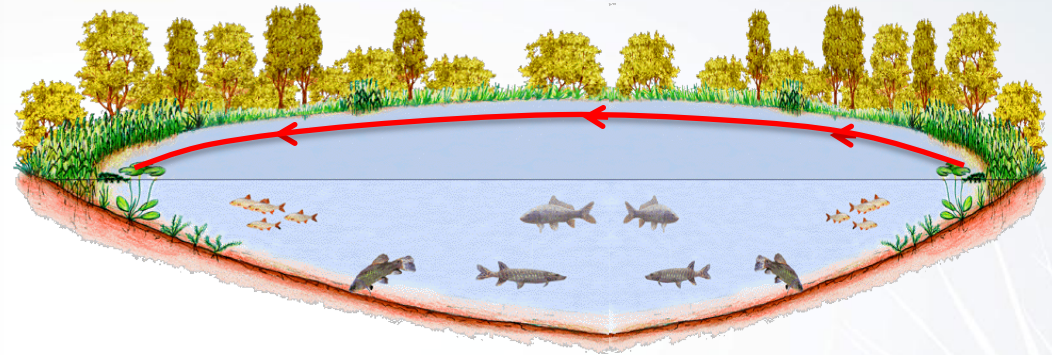
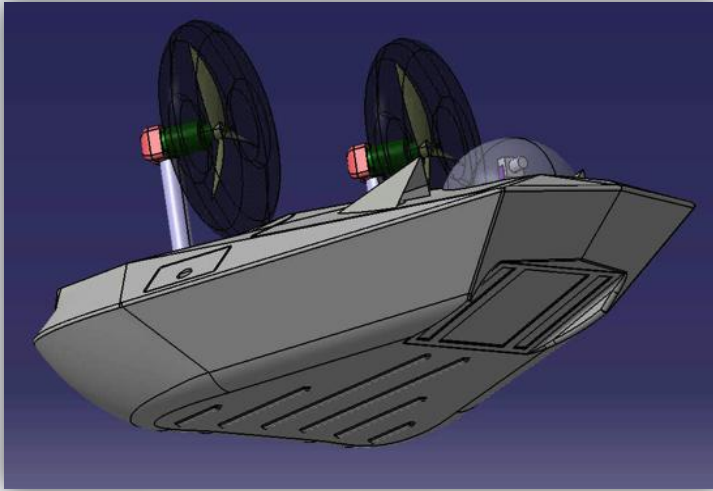


Goldberg *et al.*, 2011



Stratégie proposée

Perspectives: SPYBOAT® → échantillonnage plus exhaustif
(optimiser la détection des espèces rares)



II. Approche multispécifique (eDNA Metabarcoding)





**Les régimes alimentaires de
l'Ours brun (*Ursus arctos*) et de la
Marmotte à longue queue
(*Marmota caudata*) dans
l'Himalaya**



Deosai National Park, Pakistan



Golden marmot



Brown bear

- 12 fèces par espèce
- Amorces universelles pour les plantes

Les régimes alimentaires de
l'Ours brun (*Ursus arctos*) et de la
Marmotte à longue queue
(*Marmota caudata*) dans
l'Himalaya



Deosai National Park, Pakistan

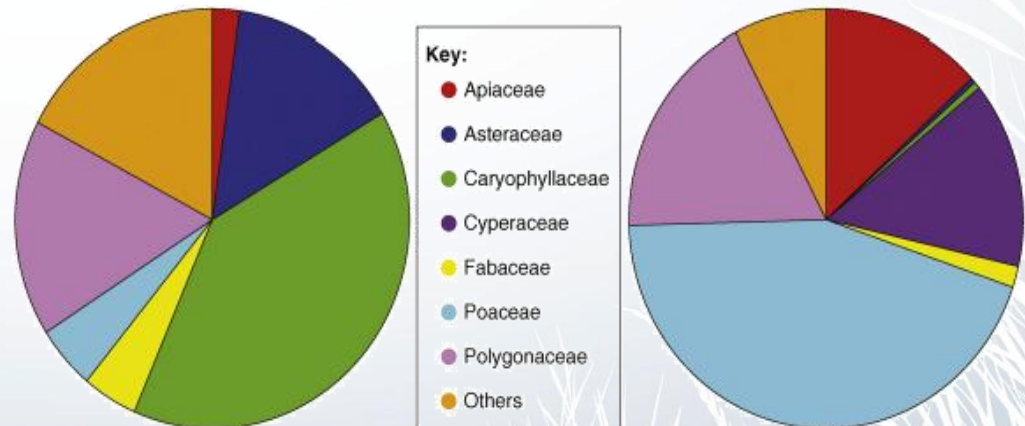


Golden marmot



Brown bear

- 12 fèces par espèce
- Amorces universelles pour les plantes



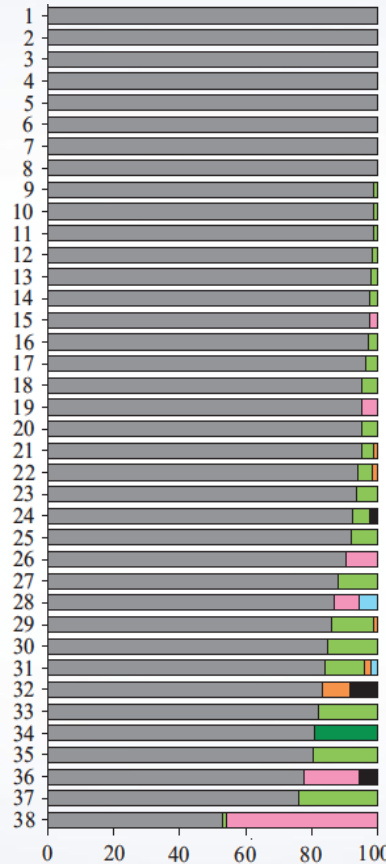
TRENDS in Ecology & Evolution

Le régime alimentaire d'une espèce carnivore : le chat-léopard (*Prionailurus bengalensis*) au Pakistan

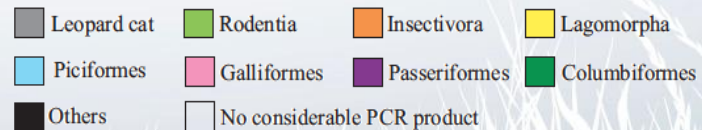
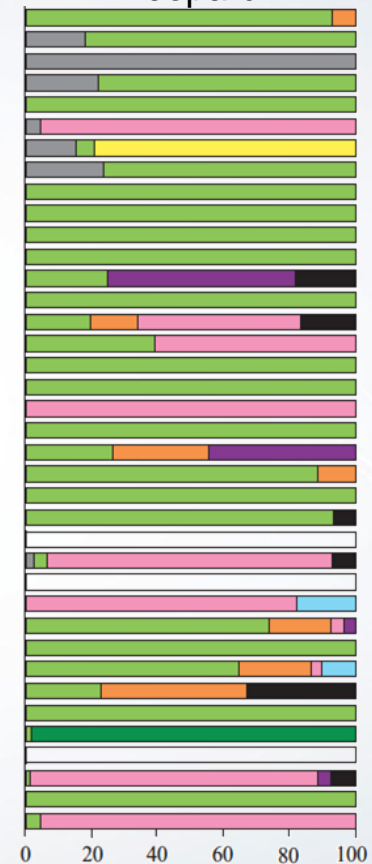


- 38 fèces
- Amorces universelles pour les vertébrés

Amorces universelles vertébrés



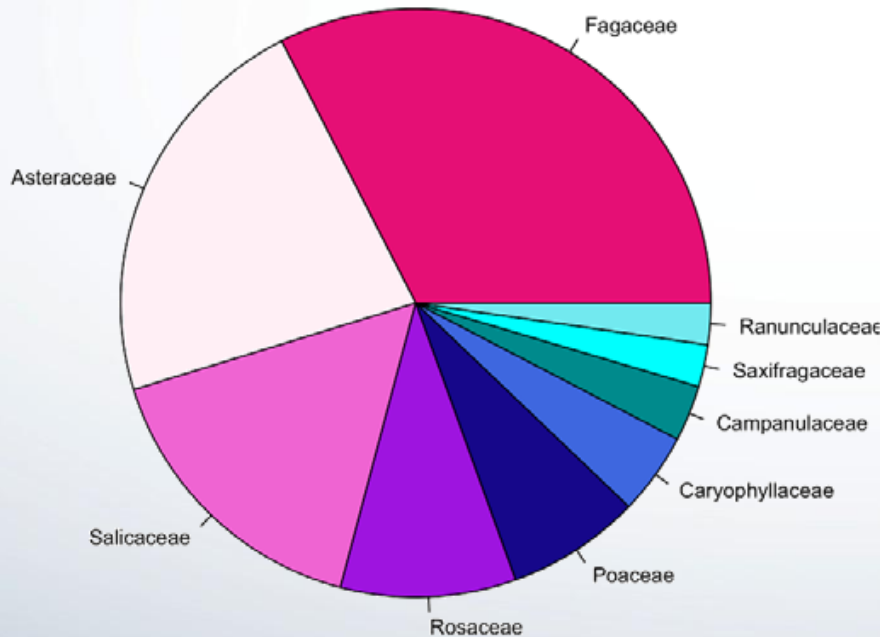
Amorces universelles vertébrés + amorces de blocage pour le chat-léopard



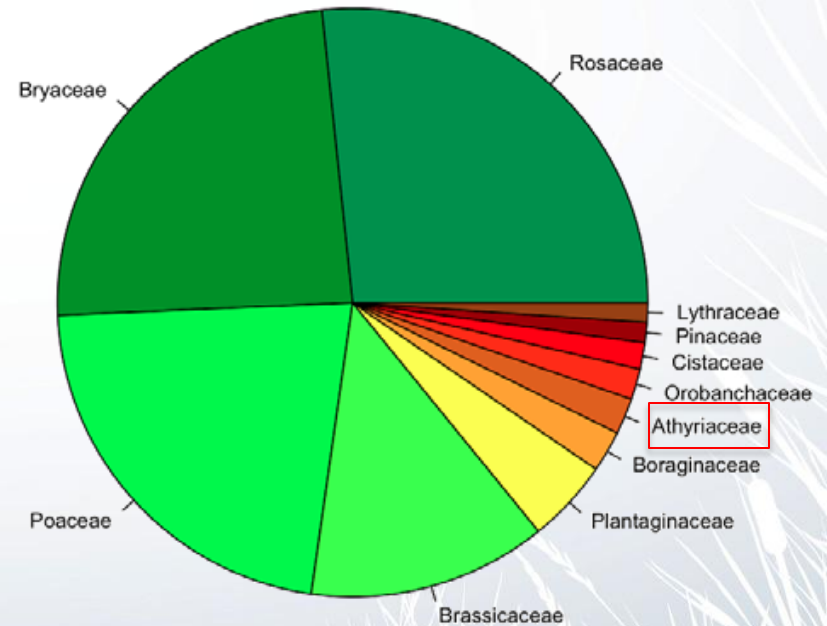
La diversité locale des
plantes reflétée par
l'analyse du miel



Pyrenees Honey



Wild Flower Honey



**Inventaire de la
biodiversité des
mammifères via l'ADN de
mouches hématophages
(*Calliphoridae* et
Sarcophagidae)**



- 201 mouches
- Côte d'Ivoire et Madagascar



II. Approche multispécifique

Diversité à l'aide d'échantillonneurs environnementaux



Cephalophus jentinki



Philantomba maxwellii



Hexaprotodon liberiensis



Hyemoschus aquaticus



Crocidura sp.



Bycanistes sp.



Arthroleptis sp.



Cerrocebus atys



Cercopithecus diana



Cercopithecus campbellii



Colobus polykomos



Piliocolobus badius badius



Cercopithecus nictitans



Atherurus africanus



Hystrix cristata

Myonycteris torquata



Hypsignathus monstrosus

Diversité des lombrics : approches basées sur l'eDNA versus méthodes classiques



Lombrics → **rôle important** dans le fonctionnement d'un écosystème

Leur diversité est un **indicateur de la santé de l'écosystème**

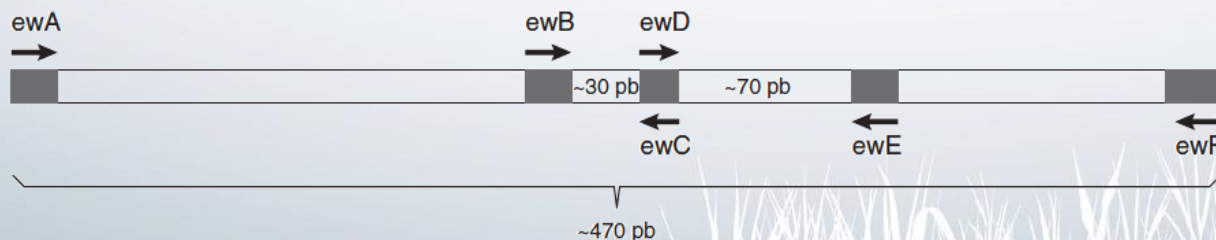
Les méthodes d'échantillonnage classiques sont laborieuses et prennent du temps =>

Intérêt de l'eDNA



Construction d'une base de référence à partir de 14 espèces provenant des Alpes françaises

Création de nouvelles amorces (16S)



Species	Chartreuse			Grenoble		
	DNA (no. of sequence reads)		Handsorting (no. of individuals)	DNA (no. of sequence reads)		Handsorting (no. of individuals)
	ewB/ewC	ewD/ewE		ewB/ewC	ewD/ewE	
<i>Allobophora chlorotica</i>	—	—	—	95 149	3918	—
<i>Aporrectodea cupulifera</i>	—	—	—	472 702	84 217	5
<i>Aporrectodea icterica</i>	1 486 631	123 684	—	2 193 386	95 841	—
<i>Aporrectodea longa</i>	—	—	—	516 596	52 225	—
<i>Aporrectodea rosea</i>	2106 (?)	17 017	—	—	—	—
<i>Aporrectodea sp.</i>	107 789	—	32	—	—	9
<i>Lumbricus castaneus</i>	—	—	—	(?)	(?)	4
<i>Lumbricus friendi</i>	—	—	7	—	—	—
<i>Lumbricus terrestris</i>	—	—	—	449 025	77 425	116
<i>Octolasion cyaneum</i>	472 285	29 482	12	—	—	—
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	306 476	14 430	—	—	—	—

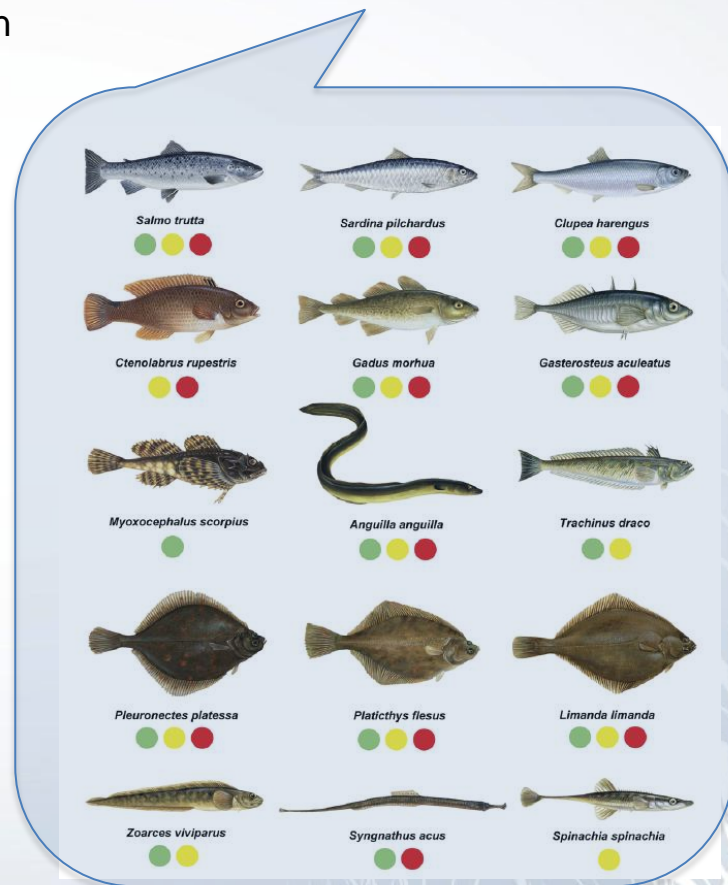
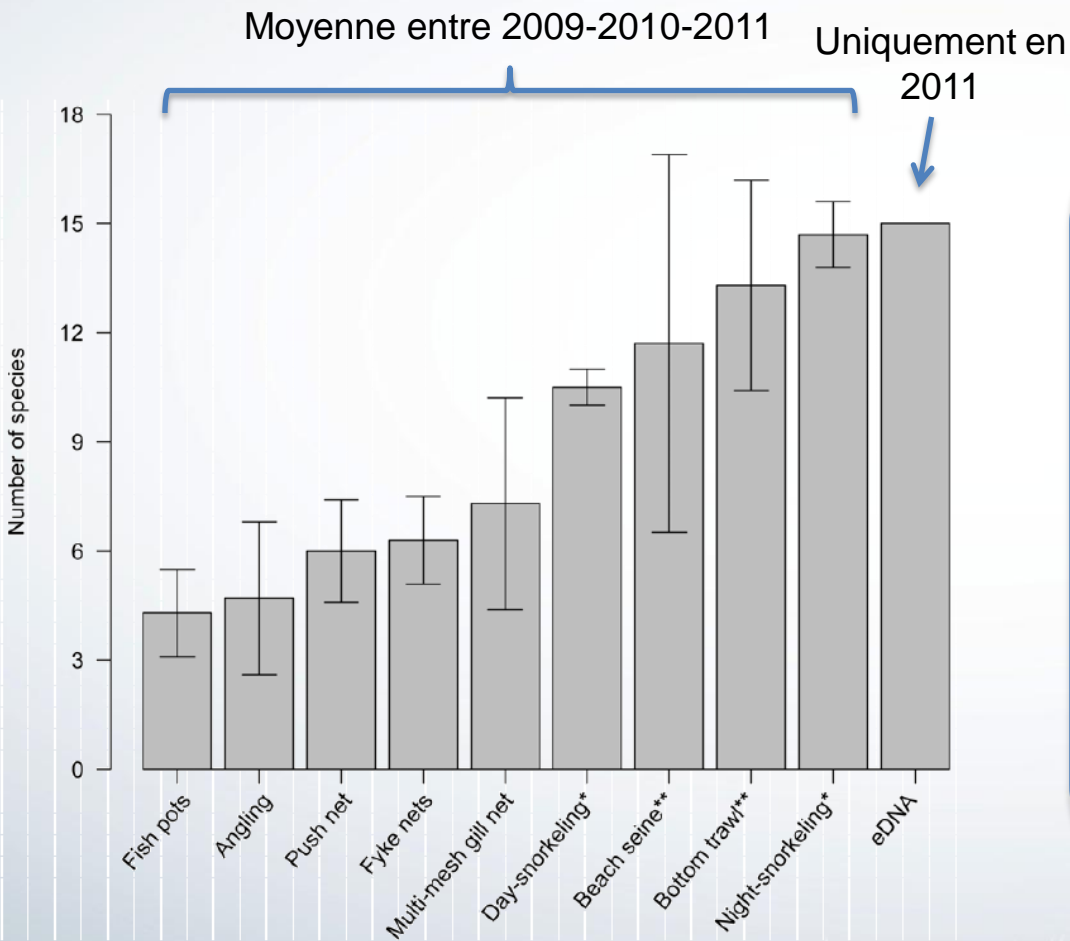


Espèces endogées

Espèces épigées

Détection de poissons marins en utilisant l'eDNA contenu dans des prélèvements d'eau de mer

A partir de 0.5 litre d'eau de mer



Les marqueurs :

- Doivent amplifier des petits fragments d'ADN
- Doivent être adaptés aux différents groupes taxonomiques
- Doivent amplifier de manière équivalente l'ensemble des espèces cibles
- Doivent avoir une bonne résolution taxonomique (idéalement à l'espèce)

Marqueurs identifiés selon ces critères

Groupe	Région	Longueur amplifiée
Amphibiens	12S	23-59 pb
Poissons Téléostéens	12S	60-80 pb
Mammifères	12S	71-87 pb
Chiroptères	12S	71-87 pb
Mollusques / Arthropodes	16S	35-40 pb
Odonates	En cours de développement	
Ecrevisses	En cours de développement	

**Biodiversité des milieux
aquatiques courants :
pêches électriques versus eDNA
metabarcoding**

Pêches électriques



eDNA metabarcoding



- Faune piscicole
- 7 sites étudiés
- Utilisation des amorces universelles poissons

III. Approche multigroupe





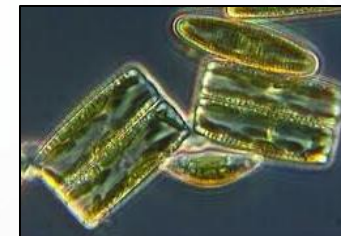
1) L'eDNA pour la bioindication

Détecter les espèces qui peuvent être utilisées pour évaluer l'état de santé d'un écosystème

Ex : macroinvertébrés, poissons, diatomées



Besoin de créer des bases de référence et d'optimiser les marqueurs



2) L'eDNA pour la veille écologique

Savoir quels organismes existent à un endroit donné

Optimiser la détection et la gestion des espèces rares, menacées ou cryptiques

Permettre la détection précoce des espèces invasives

Augmenter les chances d'éradication et ainsi diminuer les coûts

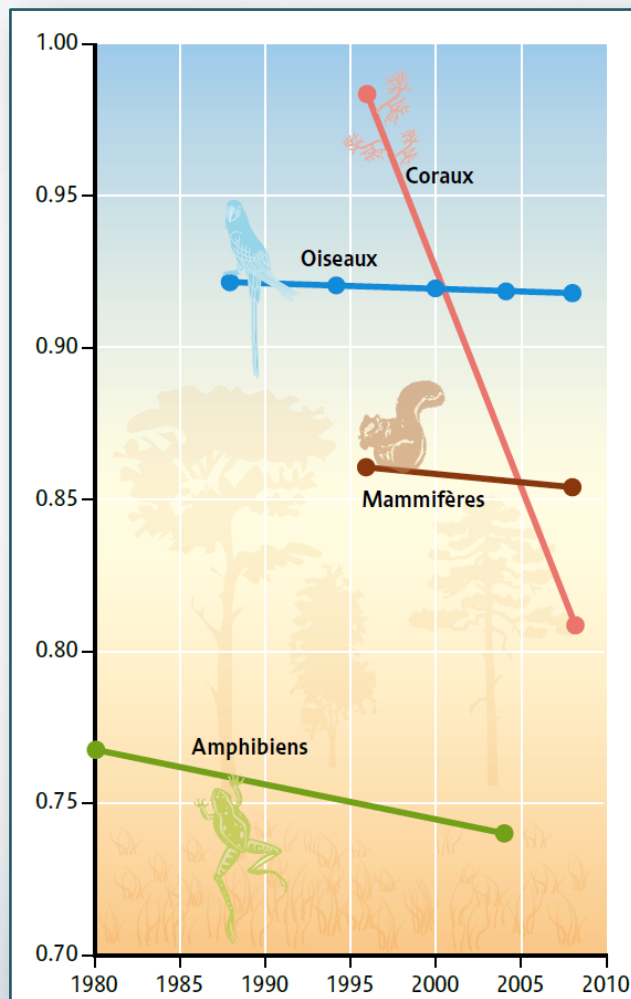
Perte de biodiversité à l'échelle mondiale depuis plusieurs dizaines d'années

Amélioration

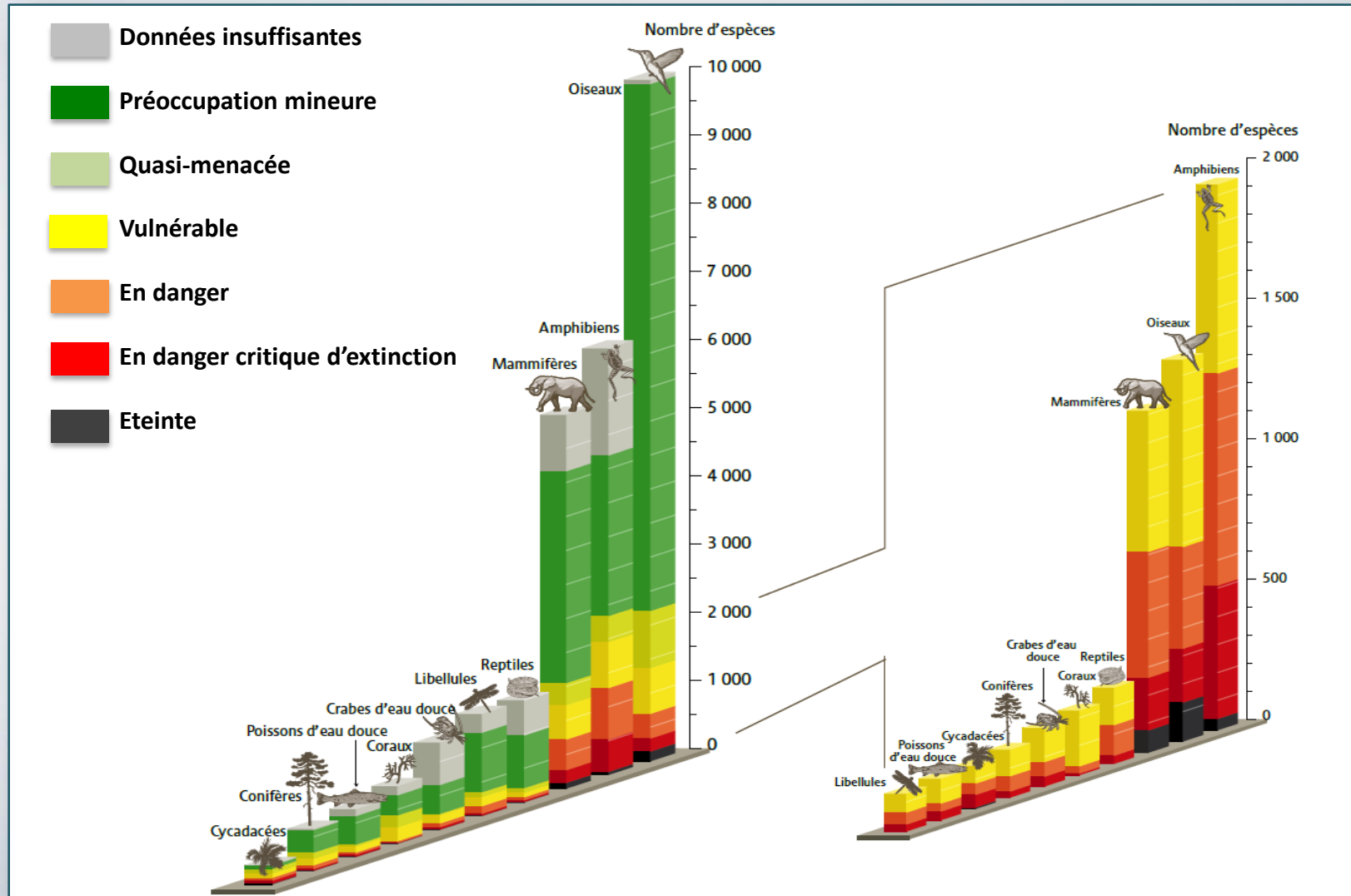


Suivre l'évolution de la biodiversité au cours du temps :
Indice Liste Rouge

Aggravation: risque d'extinction



Les espèces menacées



Par exemple, 1/3 des 6000 espèces d'amphibiens recensées sont menacées d'extinction

Les espèces invasives

Espèce naturalisée d'un territoire qui, par sa prolifération dans un milieu naturel ou semi-naturel, y produit des changements significatifs de comportement, de structure ou de fonctionnement des écosystèmes (Cronk & Fuller 1996, Muller 2000, Muller 2004).



Surveillance :

- des espèces exotiques envahissantes
- des espèces exotiques



Un outil



- d'inventaire
- de détection d'espèces menacées
- de détection précoce d'espèces invasives



Outil de veille écologique des milieux aquatiques continentaux stagnants



Amphibiens

Bufo bufo

Hyla arborea

Lithobates catesbeianus

Pelobates fuscus

Poissons

Abramis brama

Misgurnus fossilis

Rutilus rutilus

Salmo trutta

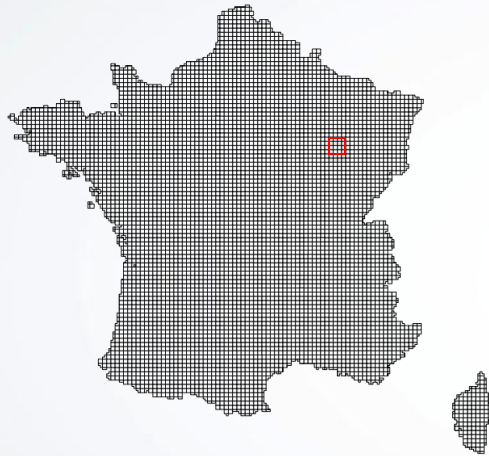
Squalius cephalus

...

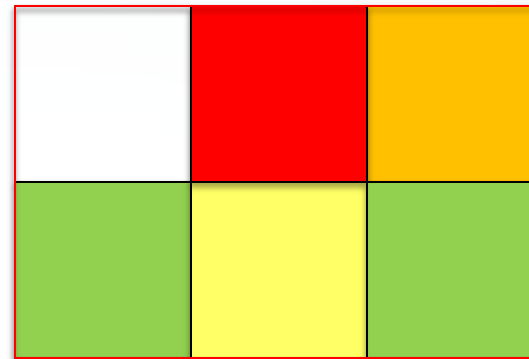
- Espèces menacées

- Espèces exotiques /
exotiques envahissantes

Outil de veille écologique des milieux aquatiques continentaux stagnants



Carte de vigilance
Mailles 10 km x 10 km



-  Vigilance forte
-  Vigilance moyenne : espèces invasives
-  Vigilance moyenne : espèces menacées
-  Vigilance faible
-  Pas de données

Outil de veille écologique des milieux aquatiques continentaux stagnants

Questionnaire

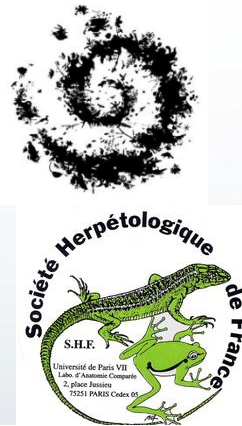


Quels groupes taxonomiques suivre?

Cet outil pourrait-il s'intégrer à vos programmes?

Une carte à l'échelle nationale pourrait-elle vous être utile?

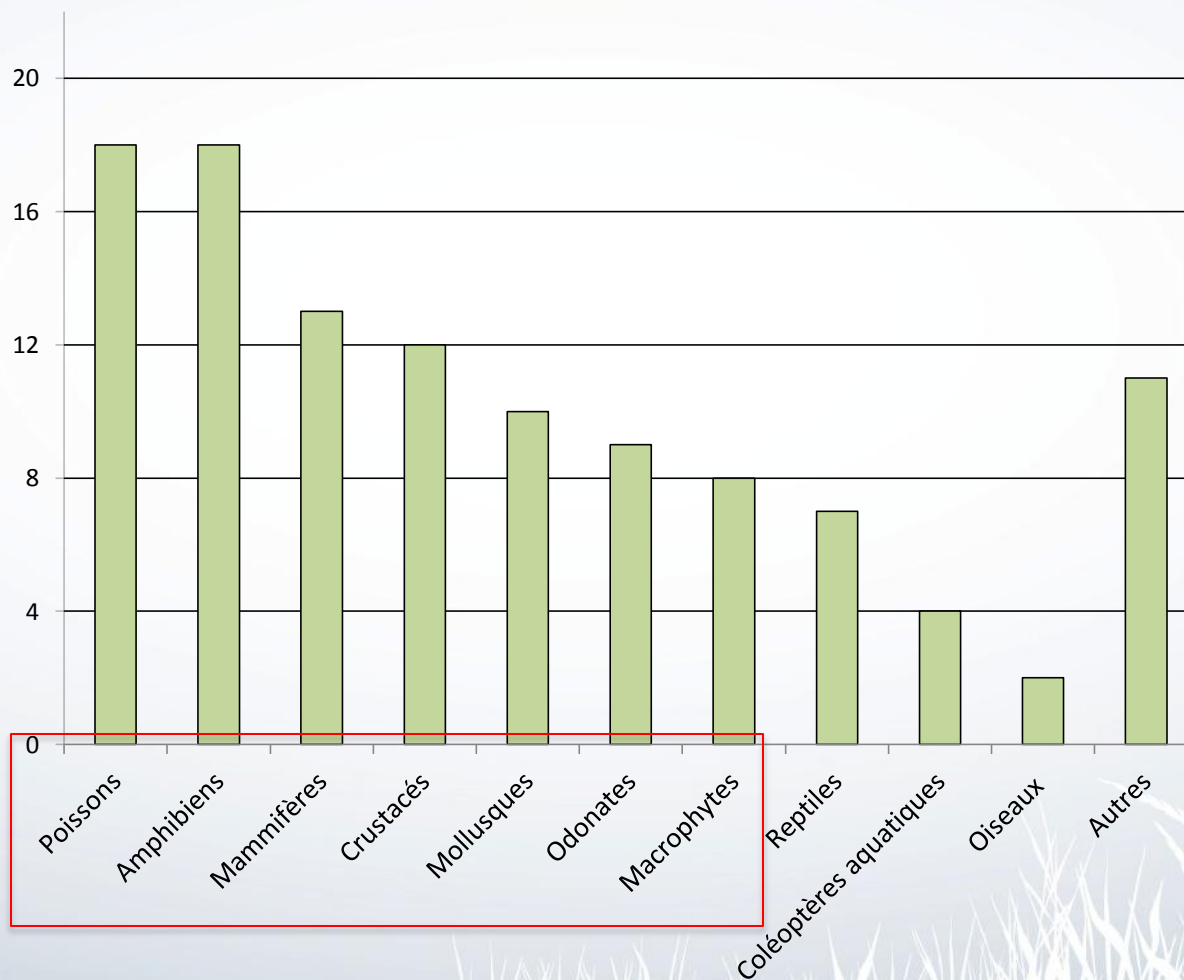
Structures interrogées



Outil de veille écologique des milieux aquatiques continentaux stagnants

Premiers résultats : les groupes taxonomiques à suivre

22 personnes
interrogées



- **Résultats significatifs**

- pour différentes applications

Détection d'espèces cibles
 Analyses du régime alimentaire
 Analyses de biodiversité

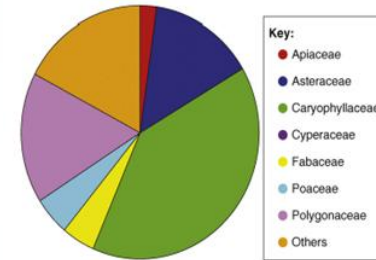
- à partir de différentes sources

Fèces

Sol

Eau

Echantillonneurs d'eDNA



- **Besoin d'optimiser:**
 - Stratégies d'échantillonnage
 - Equipements des laboratoires



- Marqueurs
- Bases de données de référence
- Bioinformatiques / Biostatistiques



Merci de votre attention!

Et merci aux collègues, partenaires et collaborateurs:

Tony Dejean, Alice Valentini, Eva Bellemain, Coline Gaboriaud, Raphaël Civade, Nicolas Poulet, et à toutes les personnes qui se sont intéressées au sujet et qui ont bien voulu répondre au questionnaire

