



ADNe barcoding & metabarcoding : Exemples chez les amphibiens exotiques envahissants

Claude MIAUD

Introduction

- Besoin de connaissance sur la biodiversité (cf hier...)
- ADNe : ADN environnemental

Approches eDNA barcoding & eDNAm metabarcoding

Etudes de cas :

- Grenouille taureau américaine
- Xénope lisse
- Grenouilles “vertes”

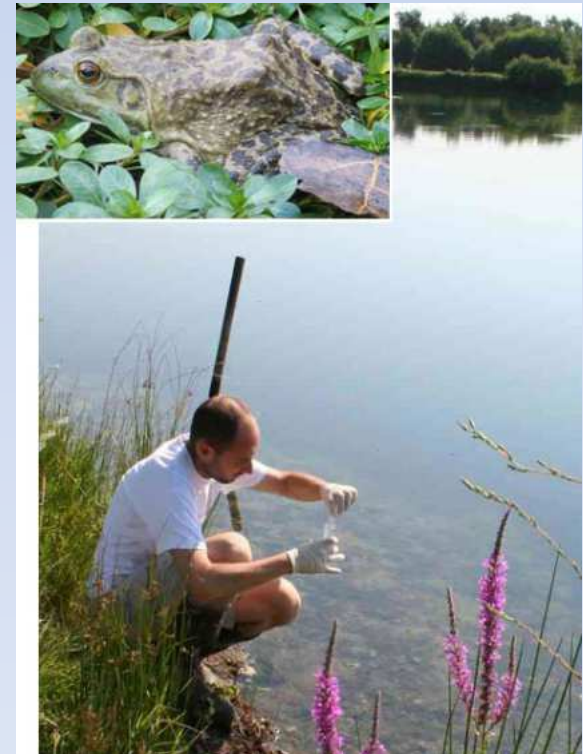
Introduction

Invasion biologique : détection précoce !

ADN environnemental comme nouvelle méthode d'inventaire

ADNe ?

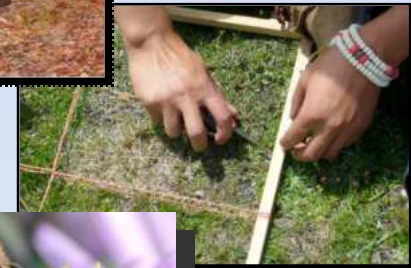
- ADN qui peut être extrait d'échantillons **environnementaux** (sols, eaux, air), sans avoir à « touché » aucun organisme ciblé
- Se caractérise par un **mélange** complexe d'ADN génomique de différents organismes et de sa **degradation...**



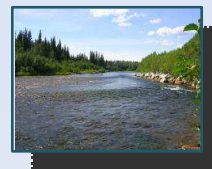
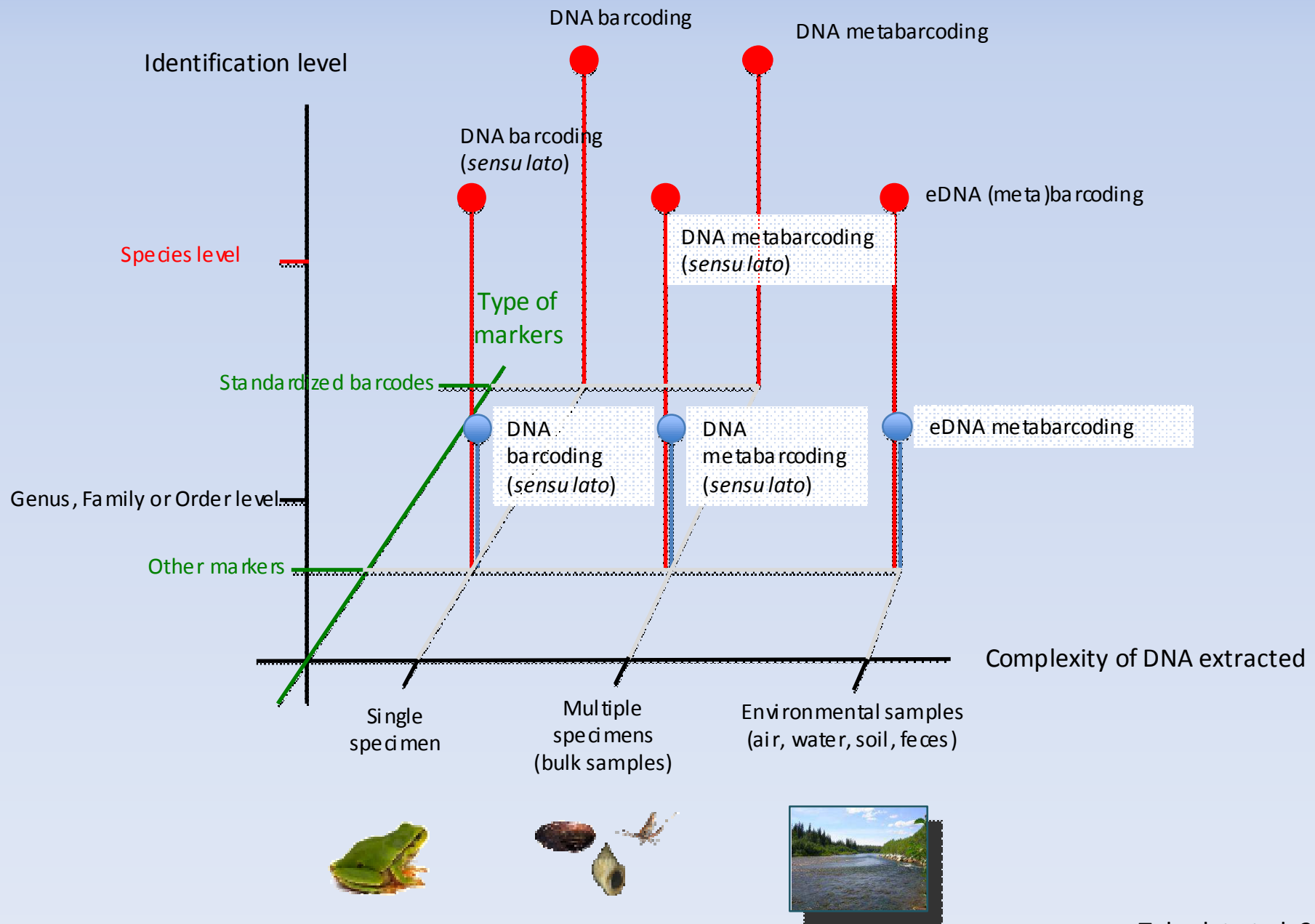
Introduction

eDNA, où ?

- **Fécès** : ADN des éléments consommés + ADN de l'hôte
- **Phanères (poils, écailles,...)**
- **Sol** :
 - DNA intracellulaire (bactéries, champignons, racines)
 - ADN extracellulaire de tous les organismes y vivants (bactéries, champignons, plantes, animaux, etc.)
- **Eau** : ADN intra et extracellulaire
animaux / plantes / microorganismes /....
- **Autres sources** : e.g. urine, traces sur le sol, neige, hématophages, charognards,.....
= **échantillonneurs environnementaux**



eDNA, terminologie

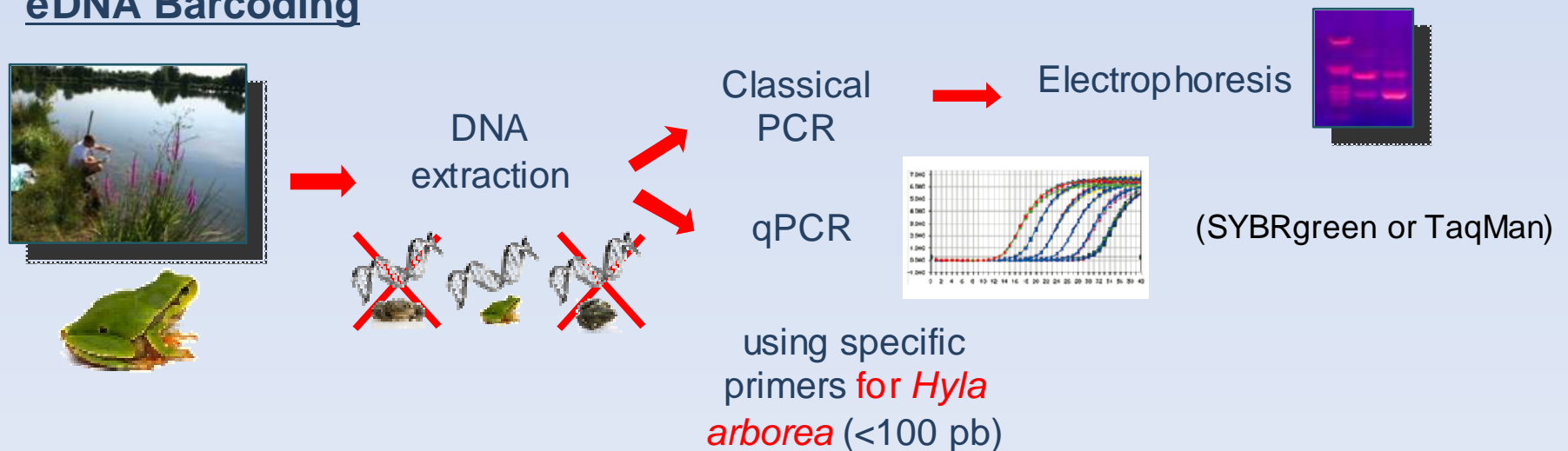


eDNA, méthodes

DNA Barcoding



eDNA Barcoding



eDNA, méthodes

eDNA Barcoding



Classical PCR

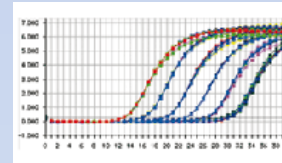


Electrophoresis



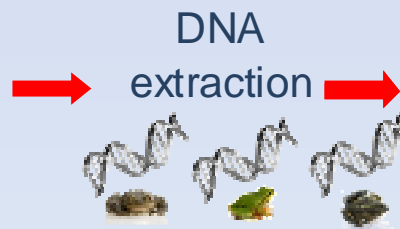
(SYBRgreen or TaqMan)

qPCR



using specific primers for *Hyla arborea* (<100 pb)

eDNA Metabarcoding



Amplification using **amphibian** primers < 100 pb



Next Generation Sequencing



Etudes de cas

Grenouille taureau américaine, milieux stagnants



9 étangs sélectionnés
3 sans G. taureau
3 avec un indice de présence
3 avec des indices de reproduction

Prélèvement de 3 tubes de 15 ml par étang
3 amplifications par tube



Table 1. Rate of bullfrog detection in water samples.

pond	bullfrog presence and relative abundance	water samples positives at least once	positive PCRs
1	yes-low	2/3	2/9
2	yes-low	3/3	6/9
3	yes-low	2/3	2/9
4	yes-high	3/3	8/9
5	yes-high	3/3	6/9
6	yes-high	3/3	8/10
7	no	0/3	0/9
8	no	0/3	0/9
9	no	0/3	0/15

Détection

- densité faible



- densité forte



- absence



Etudes de cas

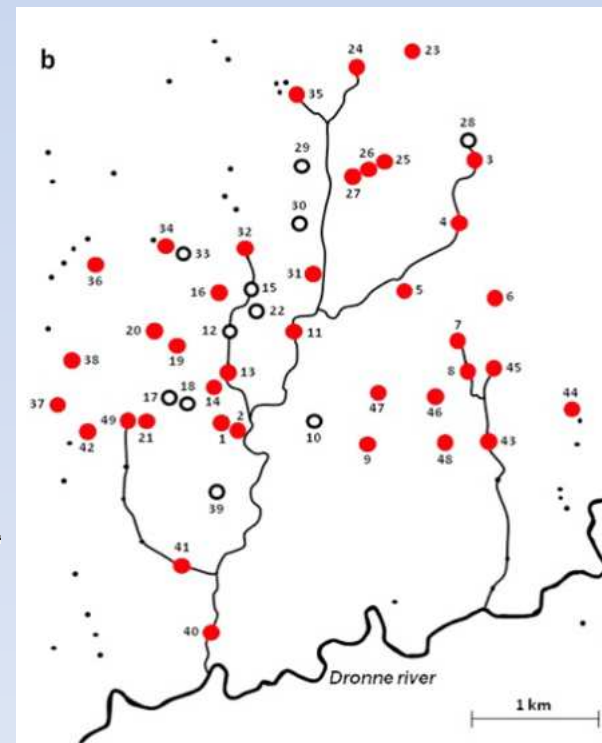
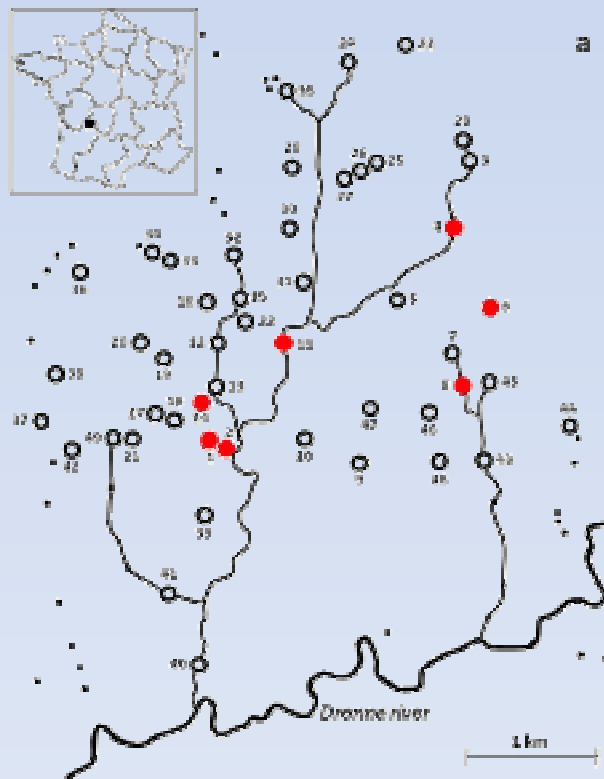
Grenouille taureau américaine Milieux stagnants

49 étangs inventoriés dans le PNR Périgord-Limousin

Inventaire classique : journée (œufs, larves) & nuit (écoute chants)

eDNA : 3 prélèvements de 15 ml d'eau, 3 amplifications par tube

Inventaire
classique
7 sites



eDNA
38 sites

→ eDNA: 2,5 times moins couteux que l'inventaire classique

Etudes de cas

Xénope lisse Milieux stagnants

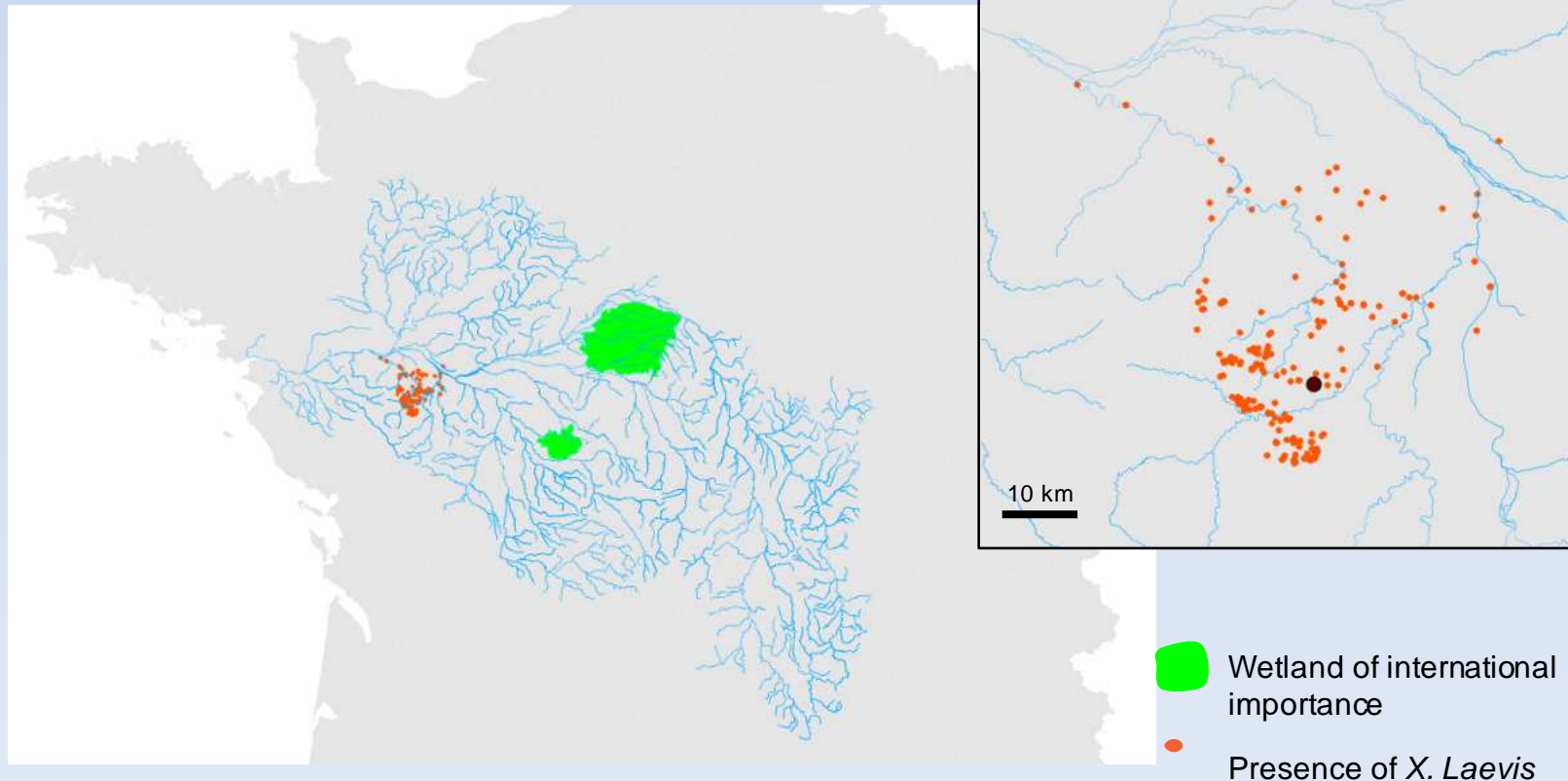


Histoire de l'invasion :

Première occurrence début 1980

Première observation 1998

Premières actions locales 2009



Etudes de cas

Xénope lisse Milieux stagnants

Test de l'utilisation de l'eDNA

9 sites sélectionnés

Campagne de pêche (époussette et nasses en Juillet et août 2013)

3 sites Xénope absent,

6 sites avec des densités très variables

20 échantillons d'eau (20 ml) réparties tout autour du plan d'eau

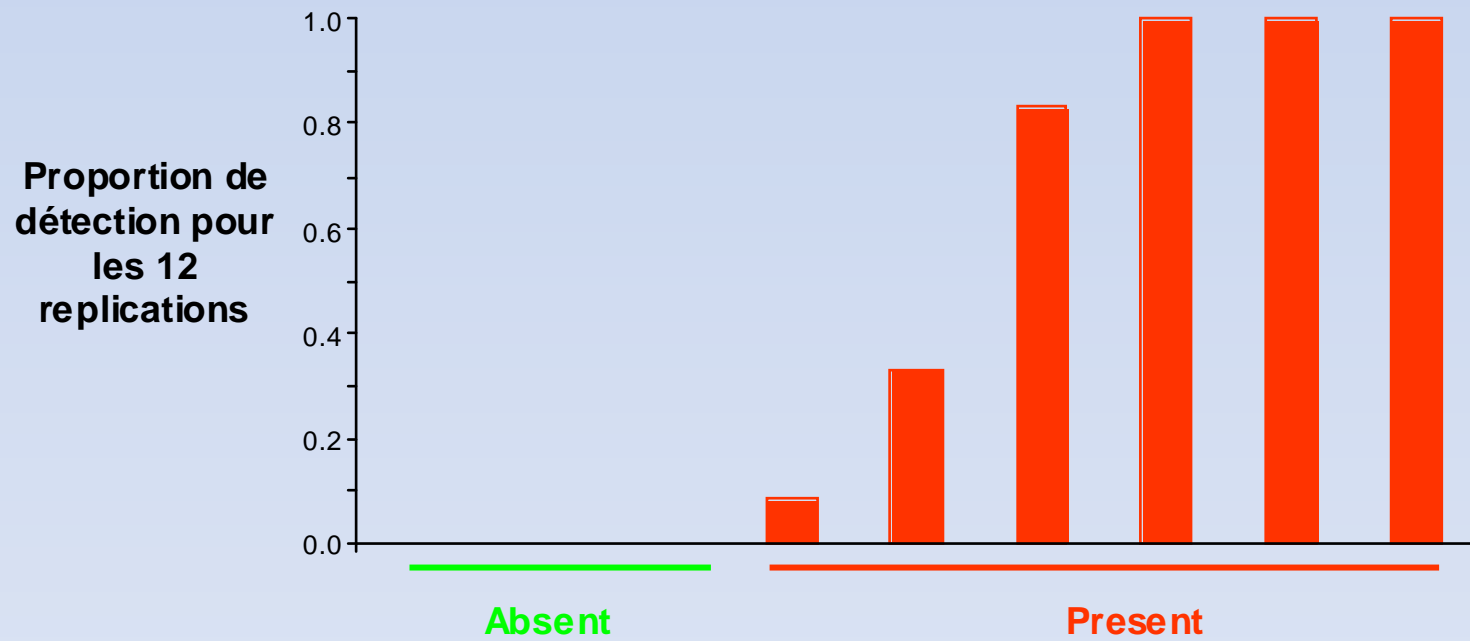
12 amplifications pour chaque échantillon d'eau



Etudes de cas

Xénope lisse
Milieux stagnants

Test de l'utilisation de l'eDNA



Etudes de cas

Xénope lisse
Milieux stagnants

Test de l'utilisation de l'eDNA



Proportion de répliquats positifs (x/12)

1.0

0.5

0.0

0.005 ind/m²

- Present
- Absent

0

0.2

0.4

0.6

0.8

1

1.2

1.4

1.6

Nb d'individus par m²



Etudes de cas

eDNA approche multispécifique : « La biodiversité dans un verre d'eau »

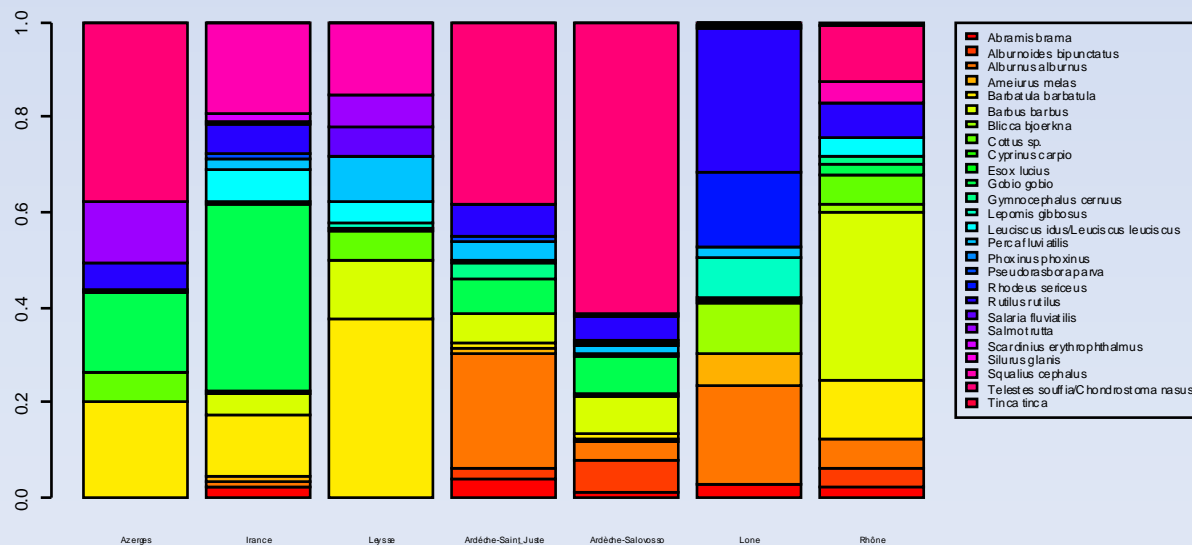
Pêche électrique



eDNA metabarcoding



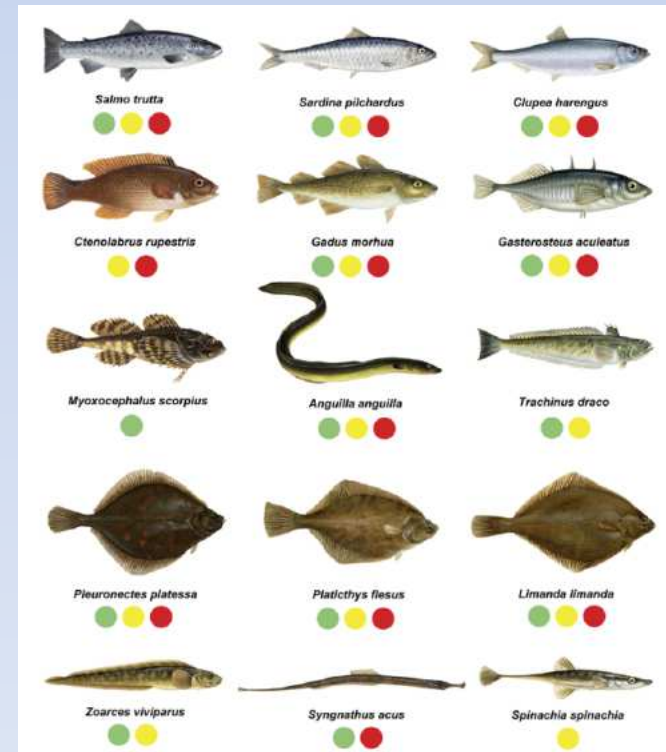
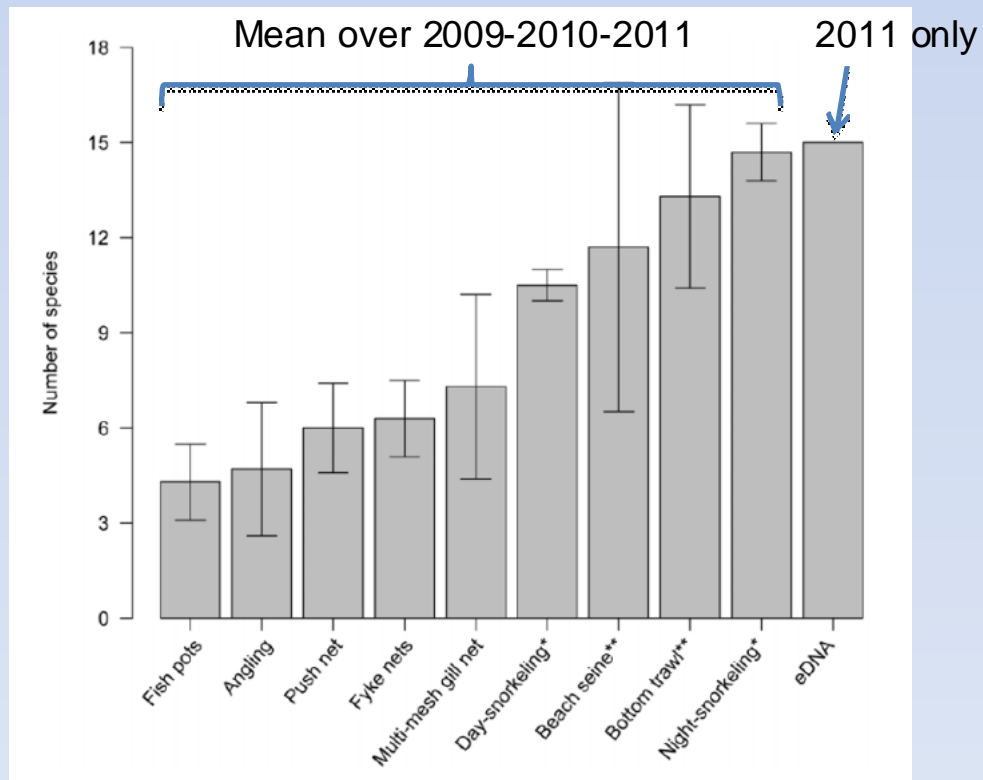
7 rivières
Rhône
Ardèche
Azergue
etc....



eDNA approche multispécifique : « La biodiversité dans un verre d'eau »

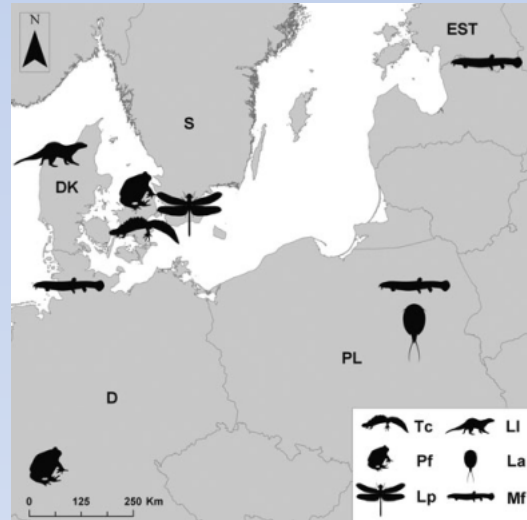
Détection de poissons marins (Danemark)

Prélèvement de 0.5 liter of seawater



Nb d'espèces de poissons détectées 9 méthodes conventionnelles (2009-10-11) et par eDNA at en 2012 à The Sound of Elsinore, Denmark.

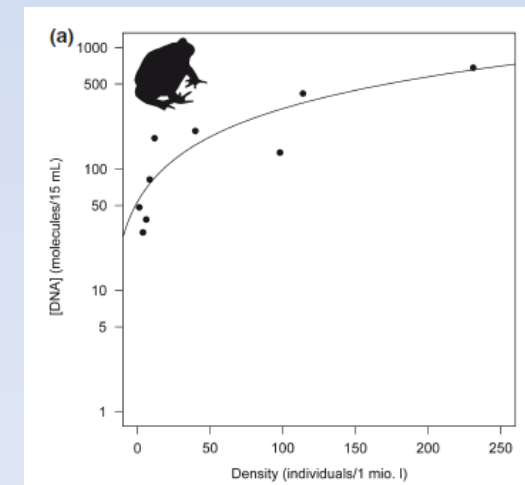
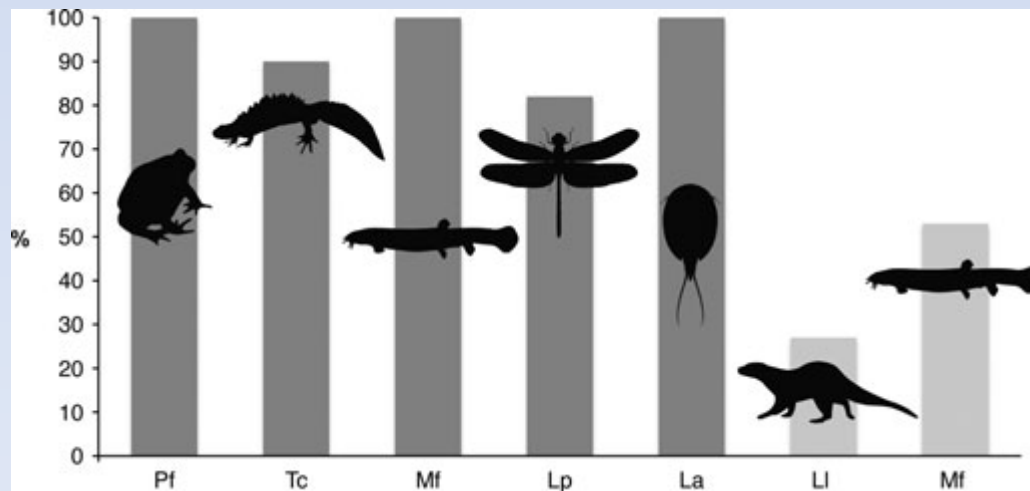
eDNA approche multispécifique : « La biodiversité dans un verre d'eau »



98 étangs et marais échantillonnés

3 x 15 ml d'eau

% de détection avec eDNA / occurrence connue
pour chaque espèce



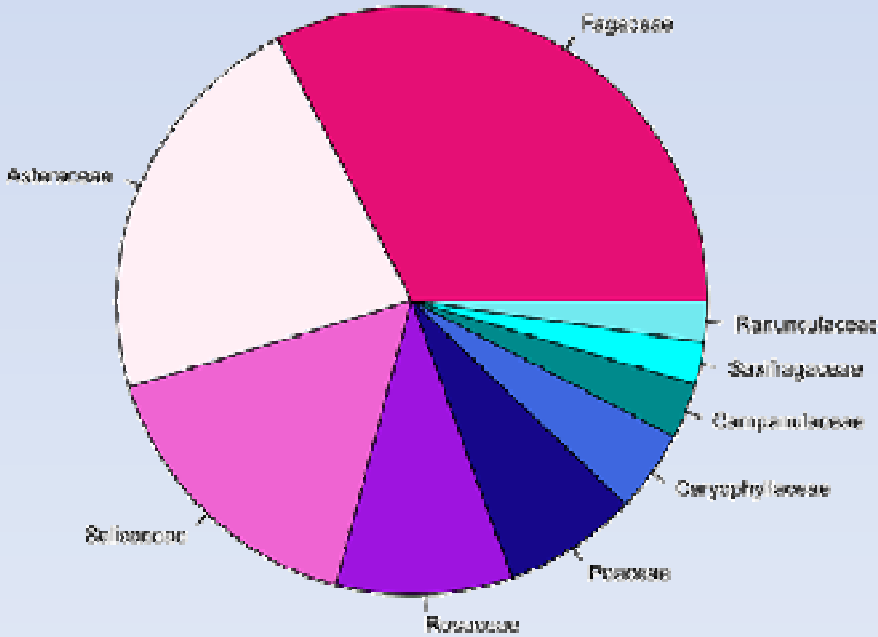
Environmental samplers



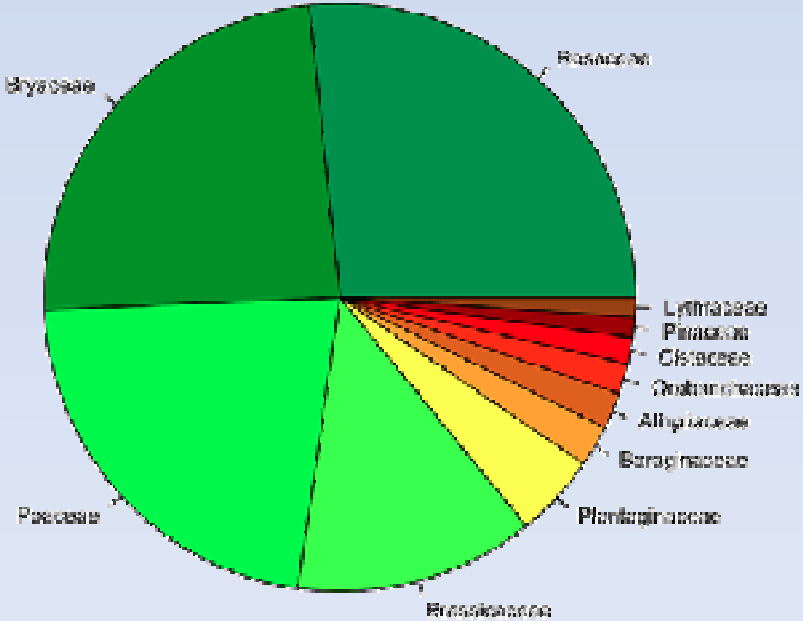
Environmental samplers



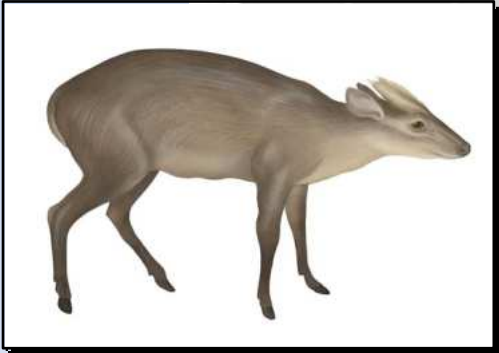
Pyrenees Honey



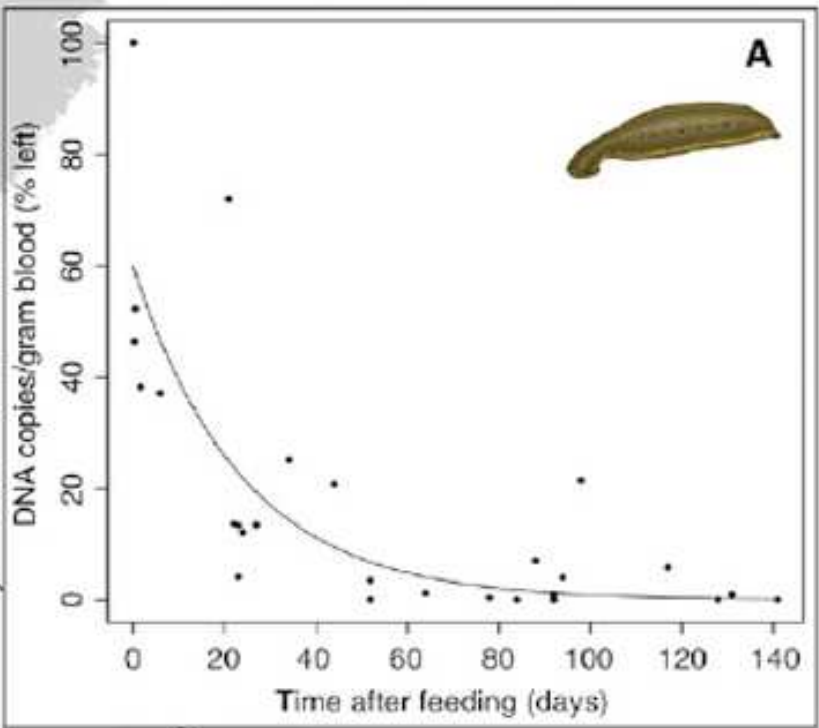
Wild Flower Honey



Environmental samplers



The Truong Son muntjac
Muntiacus truongsonensis



Environmental samplers



Environmental samplers



Cephalophus jentinki



Philantomba maxwellii



Hexaprotodon liberiensis



Hyemoschus aquaticus



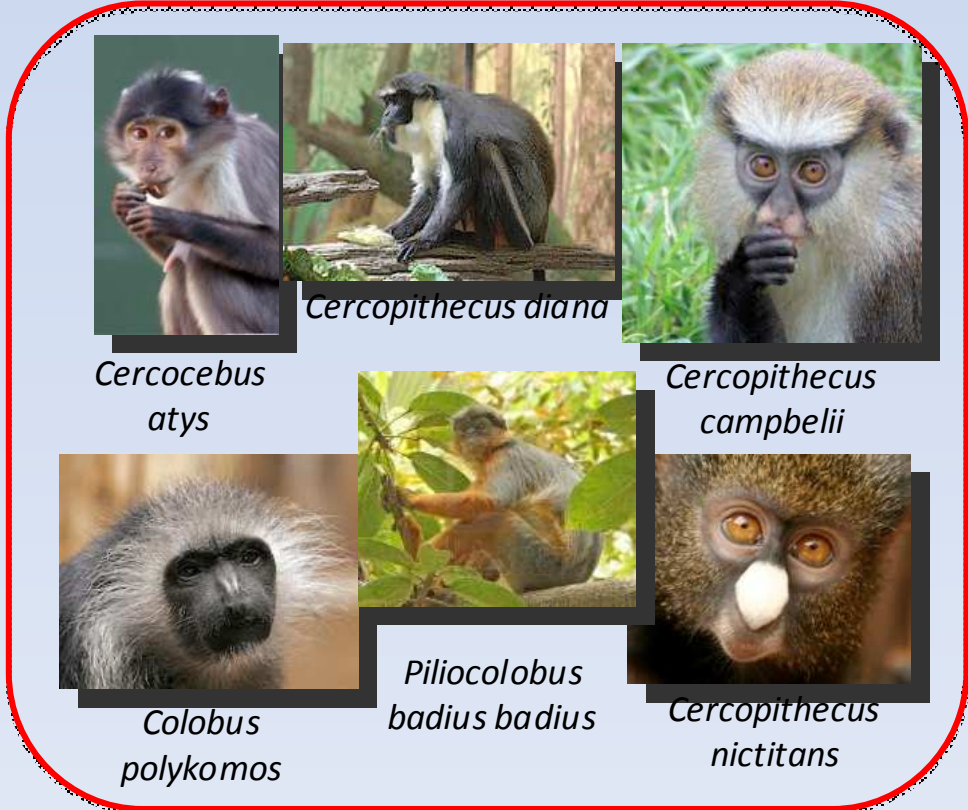
Atherurus africanus



Hystrix cristata



Crocidura sp.



Cercopithecus diana

Cercocebus atys



Cercopithecus campbellii



Colobus polykomos



Piliocolobus badius badius



Cercopithecus nictitans

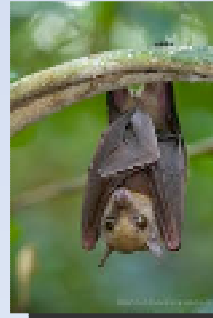


Bycanistes sp.



Arthroleptis sp.

Myonycteris torquata



Hypsignathus monstrosus

Perspectives générale pour l'eDNA

Résultats significatifs pour l'étude des plantes, animaux, fonge et différentes applications (**Diet analysis, Detection of target species, Biodiversity analyses**) et de différentes sources (**Feces, soil, water, eDNA samplers**)

Challenges : nécessité d'optimisation à different niveaux :

- Stratégie d'échantillonnage
- Process de laboratoire
- Définition et choix des marqueurs
- Bases de données de référence
- Bioinformatique/ Biostatistiques



Labo "ADN rare"



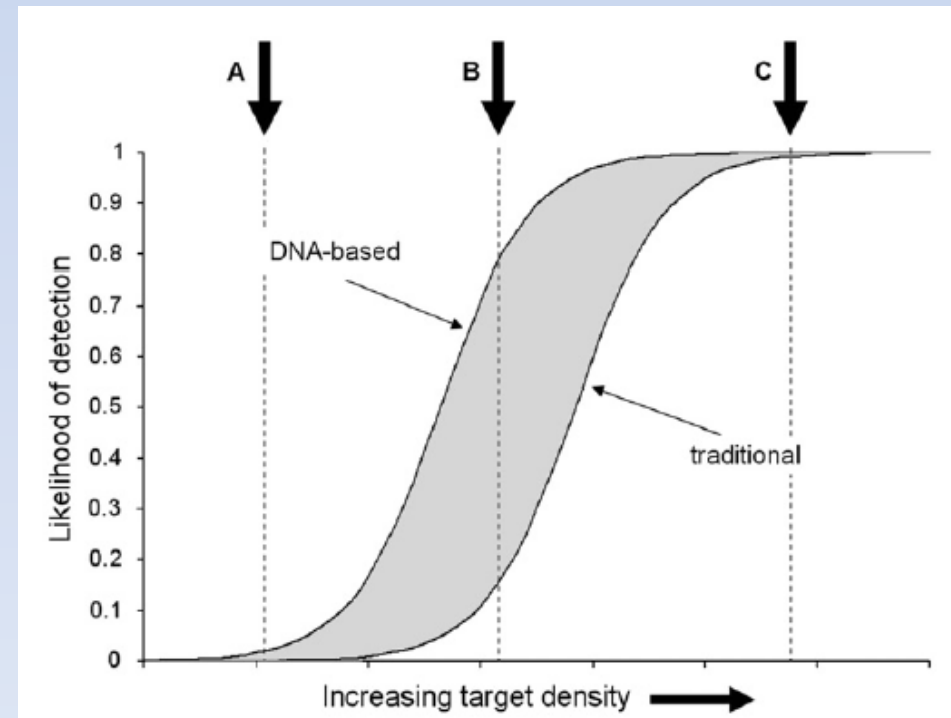
HiSeq 200

6 milliards de lecture
de 100 bases =
3000 T papier

Perspectives eDNA et invasions biologiques

Modèle hypothétique sur la sensibilité des méthodes de détection eDNA et « classiques »

- La proba de détection augmente avec la densité des espèces cibles à des rythmes différents entre les méthodes
- Zone grisée : densité où l'eDNA est plus efficace que les méthodes classiques
- A, B et C = 3 niveaux de risques induisant des décisions de gestion :
 - A : éradication possible
 - B : éradication/gestion couteuse
 - C : éradication impossible



Merci pour votre attention

Remerciements aux partenaires :



EMBO reports VOL 12 | NO 4 | 2011