

Suivi de la fonction écologique habitat par ADN environnemental

I.A.1. Introduction

La Méditerranée est considérée comme un haut-lieu de biodiversité au vu du nombre et de la diversité d'espèces qu'elle accueille (Myers et al., 2000). On dénombre à ce jour plus de **600 espèces de poissons marins en mer Méditerranée**, dont une partie majoritaire provient de l'Atlantique (Quignard and Tomasini, 2000). La partie orientale abrite plus de 66 % de cette diversité en raison du gradient thermo halin allant d'Est en Ouest (Malak et al., 2012). De même que l'Atlantique a approvisionné la partie occidentale de la Méditerranée, la partie orientale a été alimentée en espèces d'origine indopacifique par le canal de Suez (George and Athanassiou, 1967; Golani, 2005, 2000). Parmi les 600 espèces de poissons de la mer Méditerranée, **74 sont considérées comme endémiques**. Ces dernières peuplent en majorité la partie occidentale de la Méditerranée, notamment le long des côtes liguriennes, tyrrhéniennes et tunisiennes (Malak et al., 2012). La situation géographique de la Méditerranée, localisée entre l'Atlantique et la mer Rouge, lui octroie un flux d'espèces exotiques agissant comme une « pompe à diversité » (Quignard and Tomasini, 2000).

Le suivi des peuplements ichthyologiques nécessite de disposer d'une **méthode non destructive, utilisable à large échelle et dans différentes situations, sur une gamme de profondeurs recouvrant une part importante de la zone côtière**. Cette méthode doit être **peu perturbatrice** et sa mise en œuvre ne doit pas engendrer de coûts prohibitifs.

Nous avons récemment publié des preuves que l'ADN environnemental est capable d'analyser la biodiversité des vertébrés en milieu marin, y compris des espèces rares. La méthode de recherche de traces d'ADNe que nous avons développée en partenariat avec l'Université de Montpellier et Spygen est **innovante, non invasive** (prélèvement d'eau) et **exhaustive** (elle cible l'ensemble des espèces d'un groupe taxonomique donné) (Boulanger et al., 2021) et permet d'améliorer **le suivi d'espèces rares ou discrètes, et le suivi d'espèces cibles**.



Figure 1 : Picarels dans un herbier de posidonie ©Laurent Ballesta.

I.A.2. Kits de filtration

De nombreux articles scientifiques montrent que la **détection est bien meilleure lorsque de grandes quantités d'eau sont filtrées** sur chaque site d'échantillonnage (par exemple Cantera *et al.* 2019 ; Bessey *et al.* 2020 ; Lyet *et al.* 2021 ; Macher *et al.* 2021). La solution technique de SPYGEN s'appuie sur des **kits de filtration dédiés**, spécifiquement développés pour **augmenter la détection des espèces rares** grâce à une large membrane de

filtration (500 cm²) permettant la filtration d'un grand volume d'eau, et une stérilité des équipements de filtration afin d'**éviter la contamination** de l'échantillon par de l'ADN extérieur.

La collecte des échantillons d'ADN environnemental est réalisée à l'aide d'une technique permettant la filtration de **30 litres d'eau** à travers une capsule de filtration à pores de 0,2 µm. Ainsi, les **kits VigiDNA DW2**, intégrant les consommables nécessaires pour l'échantillonnage et notamment un tuyau muni d'une crépine, une capsule de filtration à très faible porosité (0,2 µm) et un tampon de conservation de l'ADN (CL1), seront utilisés. Ces kits sont **stériles** afin de prévenir toute contamination par de l'ADN humain ou autres ADN. **Pour chaque site de surveillance deux kits sont utilisés (soit deux échantillons par site).**

I.A.3. Pompe étanche pour la filtration d'ADNe in situ

Les prélèvements sont réalisés à l'aide d'une **pompe étanche** déposée au fond. Cette pompe est descendue soit depuis la surface soit par un plongeur. Ainsi, l'échantillonnage se fait par filtration de 30 litres d'eau de mer 1 m au-dessus du fond (compromis entre proximité du fond pour optimiser les chances de détecter les espèces et distance pour éviter d'obstruer le filtre par le pompage de sédiment).

Notre système étanche de filtration de l'eau de mer (pour directement recueillir l'ADNe au plus près de l'habitat à partir de la technique VigiDNA) a été **développé conjointement par l'Université de Montpellier et les entreprises Andromède Océanologie, Spygen et Subspace.**

Cette méthode maximise notre **efficacité de détection** de l'ADNe potentiellement rare en mer et **évite les contaminations** liées à l'usage de multiples contenants (sacs ou bouteilles niskin) obligeant une filtration en surface après la plongée (Deter et al, 2023¹).



Figure 2 : Pompe étanche conçue par Andromède Océanologie et l'Université de Montpellier.

I.A.4. Traitement des échantillons

Les laboratoires SPYGEN ont été créés spécifiquement pour traiter des échantillons environnementaux contenant de l'ADN rare ou dégradé. Ils offrent un environnement de type « salle blanche » permettant **d'éviter les contaminations extérieures et entre échantillons**, grâce à l'utilisation de pressions différentielles, sens de circulation et traitement UVs. La plateforme SPYGEN est composée de 5 salles d'analyses correspondant chacune à un niveau de rareté d'ADN différent. Ces salles sont réparties en 3 blocs : **ADN rare** (équipé d'un sas d'entrée – préparation des kits d'échantillonnage, extraction à partir d'échantillons d'eau, de sol ou de fèces), **ADN classique** (extraction à partir de tissus) et **ADN amplifié** (réalisation des PCR et du séquençage).

Lors de l'extraction, les échantillons sont centrifugés à 15 000 g durant 15 min, à 6°C, après quoi le surnageant sera éliminé et 360 µL de tampon ATL seront ajoutés. L'extraction est réalisée avec le kit d'extraction DNeasy Blood and Tissue (Qiagen). Un fragment d'ADN spécifique au groupe taxonomique étudié, appelé « marqueur génétique », est ensuite amplifié par PCR (Polymeric Chain Reaction) afin d'en créer des millions de copie. Pour le réseau PISCIS, nous utilisons le marqueur génétique **teleo** (Valentini et al, 2016) situé sur le gène mitochondrial 12S et ciblant les poissons (téléostéens et élasmobranches), afin de pouvoir identifier toutes les espèces de

¹ eREF : État de référence de la biodiversité en vertébrés dans les masses d'eaux côtières méditerranéennes à partir d'ADN environnemental. Rapport final. 68 pages et annexes. [Disponible ici](#)

poissons dont l'ADN est présent dans les échantillons. Cette technique est appelée **métabarcoding de l'ADN environnemental**. Après l'amplification, l'ADN amplifié est titré par électrophorèse et purifié. Le séquençage est réalisé avec un séquenceur Illumina Highseq. 12 PCR sont réalisées sur chaque échantillon pour plus de robustesse, et des contrôles positifs et négatifs sont réalisés à chaque étape du protocole d'extraction et d'amplification afin d'identifier d'éventuelles contaminations.

Afin de pouvoir assigner un taxon aux séquences génétiques amplifiées dans nos échantillons ADN, il est nécessaire de construire une base de référence répertoriant les séquences ADN des espèces connues pour le marqueur génétique utilisé (gène mitochondrial 12S). SPYGEN est actuellement en mesure **d'identifier plus de 90 % des espèces des côtes méditerranéennes occidentales françaises**. Pour PISCIS, la **base de référence la plus récente** est utilisée chaque année. La base de référence est mise à jour chaque année avec l'ajout de nouvelles séquences, et la base de référence internationale publique GenBank est utilisée en complément pour les assignations taxonomiques.

Le traitement bio-informatique des séquences issues du séquençage permet de trier et nettoyer les séquences, puis l'étape d'assignation taxonomique les compare à la base de référence afin d'identifier l'espèce à laquelle chaque séquence appartient. Le traitement bio-informatique est réalisé à l'aide du logiciel Wingy : les séquences seront alignées puis regroupées par similarité, et des filtres sont appliqués pour éliminer les erreurs de séquençage.

L'assignation taxonomique sera réalisée avec le logiciel Wingy optimisé pour le traitement des données de séquençage de poissons Méditerranéens (Mouillot et al., en révision). Le programme utilise trois entrées : les séquences devant être assignées, une base de données taxonomique renseignant les relations entre taxons, et la base de référence des poissons de Méditerranée, dont l'identifiant unique permet de les relier à la taxonomie. Chaque séquence est comparée à la base de référence et assigné au taxon correspondant lorsqu'elle présente une similarité d'au moins 98%.

Les résultats obtenus sont une liste des espèces détectées dans chaque échantillon, avec le nombre de séquences ADN et le nombre de réplicats PCR positif correspondants. Pour chaque espèce, nous renseignerons son statut de conservation IUCN, son habitat et sa provenance (native, endémique, introduite).

Les différentes étapes du traitement de l'ADN environnemental sont présentées sur la figure ci-dessous :

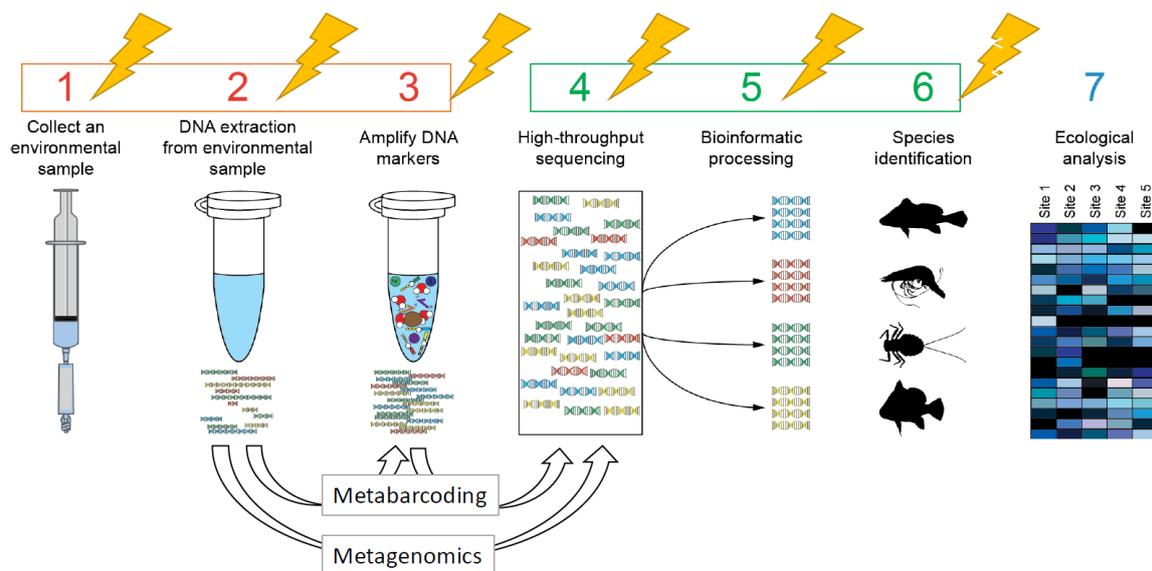


Figure 3 : Schéma récapitulatif de la chaîne de traitement des échantillons d'ADN.

I.A.5. Analyse des données

Pour chaque échantillon et site de surveillance (**deux échantillons/site**), nous établissons une **liste des espèces marines** recensées par ADNe. La base de données est manipulée et analysée avec le **logiciel R** (R Core Team, 2016). Nous calculons plusieurs **descripteurs et indices de diversité** (Dalongeville et al., 2022) dont la définition est indiquée dans le tableau suivant. Chaque site étant échantillonné par deux filtres à ADN, les deux filtres sont combinés en une seule liste d'espèces avant le calcul des indicateurs.

Tableau 1 : Descripteurs des assemblages ichtyologiques

Descripteurs	Description
Richesse spécifique	nombre d'espèces comptées sur un point d'échantillonnage
Indicateur de diversité fonctionnelle	diversité des traits écologiques (régime alimentaire, croissance, reproduction, taille etc..) au sein d'un site
Large Reef Fish Indicator	nombre d'espèces de poissons de récif de grande taille (20 cm ou plus à l'âge adulte)
Indicateur crypto-benthique	nombre d'espèces de poissons de récif de petite taille (10 cm ou moins à l'âge adulte)
Indicateur UICN	Nombre d'espèces présentes sur la liste rouge de l'UICN pondéré par catégorie UICN
Indicateur non indigène	Nombre d'espèces invasives ou exotiques présentes sur le site échantillonné
Indicateur thermique	température "préférée" des espèces de poissons sur un site
Indicateur démerso-pélagique/benthique	Ratio du nombre d'espèces démerso-pélagiques sur le nombre d'espèces benthiques

Ces indicateurs sont calculés à différentes échelles :

-  **Site** (deux habitats confondus) ;
-  **Site-Habitat** (habitat pour chaque site) ;
-  **Habitat** (tous sites confondus).

Publications scientifiques sur les méthodes ADNe

Avec plus de **70 publications scientifiques** à son actif, **SPYGEN est un leader mondial sur l'ADN environnemental**. Les thématiques varient tant au niveau des groupes taxonomiques recherchés (espèces ciblées, Poissons, Bivalves, Mammifères, Plantes, pathogènes...) que des matrices étudiées (eau douce, milieu marin, sols, fèces, ...). Les 10 publications énoncées ci-dessous présentent les principaux travaux de SPYGEN sur ces 10 dernières années.

Dejean, T., **Valentini, A.**, Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>

Résumé : Il s'agit de la première étude comparative montrant l'intérêt de l'ADN environnemental pour une espèce de Vertébrés : la grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*), avec détection de l'espèce sur 38 sites par l'ADNe versus 7 sites par des inventaires classiques (passages diurne et nocturne). Cela a ouvert le champ des possibles pour cette nouvelle méthode, en montrant notamment son intérêt pour la détection précoce d'espèces exotiques envahissantes.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., **Gaboriaud, C.**, **Jean, P.**, Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>

Résumé : Il s'agit du premier article scientifique validant l'utilisation de l'approche ADNe metabarcoding pour l'inventaire des amphibiens et des poissons. Pour les amphibiens, la probabilité de détection avec l'ADNe metabarcoding était de 0,97 (IC = 0,90–0,99) contre 0,58 (IC = 0,50–0,63) pour les méthodes traditionnelles. Pour les poissons, dans 89% des sites étudiés, le nombre de taxons détectés par l'approche ADNe metabarcoding était supérieur ou identique au nombre détecté par les méthodes traditionnelles. Les approches basées sur l'ADNe sont donc des outils performants pour les études écologiques et le suivi de la biodiversité dans un large éventail d'écosystèmes aquatiques.

Pont, D., Rocle, M., **Valentini, A.**, Civade, R., **Jean, P.**, Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., & Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports*, 8(1), 10361. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>

Résumé : Cette étude, menée avec la Compagnie Nationale du Rhône, est la première à décrire les communautés piscicoles le long du gradient longitudinal d'un fleuve (le Rhône français, soit environ 500 km). Une seule session d'ADNe metabarcoding a permis de détecter des assemblages de poissons similaires à 10 ans de pêches électriques en termes qualitatifs et quantitatifs (abondance relative des espèces).

Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., **Jean, P.**, Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarik, L., Schabuss, M., Stoeckle, B. C., Stoica, E., Zornig, H., Weigand, A., & **Valentini, A.** (2022). Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>

Résumé : Cette étude, réalisée sur 2850 km dans le bassin versant du Danube montre que l'ADNe metabarcoding couplé avec une qPCR (pour estimer l'abondance totale d'ADN amplifié) permet de donner une estimation approximative de l'abondance des espèces de poissons détectées. Elle montre également l'importance d'avoir un effort d'échantillonnage important dans les grandes rivières pour pouvoir arriver à ce résultat. Ces données ont permis de fournir une description complète des changements longitudinaux dans les communautés de poissons du Danube.

Cantera, I., Coutant, O., Jézéquel, C., Decotte, J.-B., Dejean, T., Iribar, A., Vigouroux, R., **Valentini, A.**, Murienne, J., & Brosse, S. (2022). Low level of anthropization linked to harsh vertebrate biodiversity declines in Amazonia. *Nature Communications*, 13(1), 3290. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30842-2>

Résumé : Dans cette publication, l'ADNe metabarcoding a été utilisé pour évaluer les relations entre la biodiversité des vertébrés (poissons et mammifères) et l'intensité des perturbations anthropiques (en termes de pertes de couvert forestier) dans deux rivières amazoniennes (l'Oyapock et le Maroni). Les résultats suggèrent que l'anthropisation a eu un impact spatialement étendu sur la biodiversité. Les pertes de couvert forestier de moins de 11 % dans les zones situées jusqu'à 30 km en amont des sites d'échantillonnage de la biodiversité étaient liées à des réductions de plus de 22 % de la richesse taxonomique et fonctionnelle de la faune terrestre et aquatique. Cela souligne la vulnérabilité de la biodiversité amazonienne, même à de faibles niveaux d'anthropisation.

Prié, V., Valentini, A., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Rocle, M., Poulet, N., Taberlet, P., & Dejean, T. (2020). Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04260-8>

Résumé : Cette publication présente la première étude menée par ADNe metabarcoding sur les Bivalves d'eau douce (sur près de 300 sites). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus à l'aide de méthodes traditionnelles et l'ADNe metabarcoding a toujours détecté plus d'espèces, en particulier lorsque les *Sphaeriidae* étaient pris en compte. Les résultats montrent que l'ADNe metabarcoding, utilisé avec les amorces que nous avons développées, est un outil remarquable permettant des études non invasives, la détection d'espèces rares et discrètes, des données sur les absences et un suivi général de la routine des bivalves d'eau douce.

Coutant, O., Richard-Hansen, C., Thoisy, B. de, Decotte, J., **Valentini, A.,** Dejean, T., Vigouroux, R., Muriene, J., & Brosse, S. (2021). Amazonian mammal monitoring using aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 21(6), 1875–1888. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13393>

Résumé : Dans cette publication, le potentiel de l'ADNe metabarcoding pour la détection des mammifères (aquatiques, semi-aquatiques ou terrestres) dans des environnements néotropicaux a été étudié. Pour cela, 96 sites répartis le long de trois bassins versants guyanais ont été échantillonnés puis comparés aux données disponibles sur la distribution des espèces et aux observations de terrain. Les résultats montrent que l'ADNe metabarcoding donne non seulement des résultats concordants avec la distribution attendue des mammifères, mais apporte également des données supplémentaires aux observations concernant les espèces non aquatiques diurnes (terrestres et arboricoles). L'ADNe a également fourni des données sur des espèces non détectables par observation, telles que les espèces semi-aquatiques, aquatiques et nocturnes (terrestres et arboricoles).

Lopes, C. M., Baêta, D., **Valentini, A.,** Lyra, M. L., Sabbag, A. F., Gasparini, J. L., Dejean, T., Haddad, C. F. B., & Zamudio, K. R. (2020). Lost and found: frogs in a biodiversity hotspot rediscovered with environmental DNA. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.15594>

Résumé : Cette étude montre l'intérêt de l'ADN environnemental pour la détection d'espèces menacées d'Amphibiens dans différents milieux aquatiques au Brésil. Il a ainsi été possible de détecter des traces d'ADN de quatre espèces en déclin, de deux espèces localement disparues et d'une espèce qui n'a pas été observée depuis 1968, soulignant tout l'intérêt de l'ADNe metabarcoding en biologie de la conservation.

Yoccoz, N. G., Brathen, K. A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M. E., Goslar, T., Stedingk, H. V., Brysting, A. K., Coissac, E., Pompanon, F., Sørenstebø, J. H., Miquel, C., **Valentini, A.,** Bello, F. D., Chave, J., Thuiller, W., Wincker, P., Cruaud, C., Gavory, F., ... Taberlet, P. (2012). DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. *Molecular Ecology*, 21(15), 3647–3655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05545.x>

Résumé : Cette publication montre l'intérêt des méthodes ADNe metabarcoding pour la caractérisation des communautés de plantes dans le sol dans trois situations différentes :

La diversité végétale détectée par ADNe dans le sol de huit communautés végétales boréales était très cohérente avec la diversité taxonomique des plantes estimées à partir d'études conventionnelles au-dessus du sol.

Le nombre de séquences ADN de cultures variait fortement en fonction du nombre d'années écoulées depuis la dernière culture, avec une absence de séquences de ces cultures dans les parcelles voisines non cultivées.

Les méthodes ADNe metabarcoding permettent de travailler dans des milieux variés car des analyses dans des échantillons de sol provenant d'environnements tropicaux ont également permis la détection d'une grande proportion d'espèces et de familles de plantes présentes sur les sites d'étude.

Giampaoli, S., Berti, A., Maggio, R. M. D., Pilli, E., **Valentini, A.**, Valeriani, F., Gianfranceschi, G., Barni, F., Ripani, L., & Spica, V. R. (2014). The environmental biological signature: NGS profiling for forensic comparison of soils. *Forensic Science International*, 240, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.028>

Résumé : Cette publication montre l'intérêt de l'utilisation de l'ADN environnemental pour caractériser des échantillons de sols dans le cadre d'enquêtes médico-légales. En étudiant les eucaryotes, les procaryotes et les plantes, il a ainsi été possible de discriminer des échantillons géologiquement très similaires mais provenant d'environnements distincts.