

LES RENDEZ-VOUS DU MAB

#16 L'ADN environnemental

29 septembre 2022

L'ADN environnemental est une nouvelle technique d'inventaire de la biodiversité à partir de brins d'ADN laissés par les espèces animales et végétales dans le milieu naturel. Après plus de 10 années de recherche et développement, cette technologie est dorénavant suffisamment fiable pour être déployée largement de façon complémentaire aux outils d'inventaire déjà mobilisés en fonction des besoins et des questions posées par les futurs utilisateurs.

Vincent Prié, directeur de projet pour la société Spygen, présente cette technologie et les applications concrètes en particulier pour les gestionnaires d'espaces naturels. En complément, **Arnaud Collin, préfigurateur de l'Alliance Vigilife** complétera cette intervention en présentant une initiative internationale en cours de développement visant à soutenir les porteurs d'enjeux et les acteurs académiques qui renforcent ou mettent en place des dispositifs de surveillance de long-terme de la biodiversité grâce à l'ADN environnement.

L'ADN environnemental : principes, avantages, retours d'expériences et perspectives

Tous les organismes relâchent des cellules dans l'environnement, ces cellules vont se dégrader. Elles contiennent de l'ADN nucléaire et mitochondrial. C'est ce dernier qui est le plus intéressant car plus abondant et plus facile à détecter. Cet ADN peut être détecté dans l'environnement, essentiellement dans l'eau, mais également dans l'air et dans les sols. En comparant ces fragments d'ADN à des bases de données de référence, on peut inventorier l'ensemble du vivant dans un échantillon donné.

Dès 2008, les premières publications ont montré la présence d'amphibiens dans une mare, puis cette technique a pu être utilisée pour des mammifères, des poissons, des bactéries.

La revue *Environmental data* est une revue scientifique entièrement dédiée à l'ADN environnemental.

La méthodologie

Plusieurs échantillons d'eau sont prélevés dans un environnement donné (dans l'eau, la concentration est plus élevée et augmente significativement la probabilité de trouver des

traces d'ADN des espèces présentes). Cette eau est filtrée et l'ADN est extrait, amplifié puis séquencé. L'analyse des résultats permet d'obtenir une liste d'espèces.

Deux facteurs sont importants : un matériel stérile, non contaminé et une base de données fiable au niveau taxonomique, pour ne pas faire d'erreur en réassignant les séquences identifiées aux espèces connues.

Des erreurs liées à des problèmes de contamination sont possibles. Par exemple, les faux négatifs : l'animal est là mais on ne parvient pas à le détecter, ou les faux positifs : on pense l'avoir détecté mais elle n'est pas présente.

Des hauts standards de qualité doivent être respectés, et pour cela il est important de prélever de gros volumes sur chaque site (3x30l d'eau filtrée) permettant de rechercher des espèces rares.

Avantages et perspectives

Le défi des grands fleuves.

Dans un fleuve aussi vaste que la Loire, une espèce de mollusque d'environ 1mm a pu être identifiée. Les techniques traditionnelles (plongée, filtrage, observation) sont beaucoup plus lourdes et plus aléatoires.

Autres exemples comparant les méthodes traditionnelles et la technologie de l'ADNe.

Sur le Rhône, un prélèvement d'ADNe équivaut à 10 ans de pêche électrique, en termes d'inventaires.¹

La recherche de l'ADNe a été déployée à large échelle sur le triton crêté². La présence du triton crêté a été trouvée dans de nombreuses mares dans lesquelles il n'était pas connu.

La recherche d'ADN environnemental présente aussi un grand intérêt pour les espèces envahissantes, en termes de détection précoce ; elle permet de la signaler au-delà des sites sur lesquels elle a déjà été observée.³

¹ **Pont, D.,** Rocle, M., Valentini, A. et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci Rep* 8, 10361 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>

Prié, V. et al. (2021): Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia* 848, 2931–2950 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04260-8>

Valentini, A. et al. (1996): Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, Volume 25, Issue 4, pages 843-1021p. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mec.13428>

² **Biggs, J et al.** (2015) : Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, vol 183, pages 19-28 . <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006320714004546>

³ **Vimercati, G et al.** (2019). Assessing the effect of landscape features on pond colonisation by an elusive amphibian invader using environmental DNA. *Freshwater Biology* , vol 65, 3, pages 502-513. <https://doi.org/10.1111/fwb.13446>

La recherche de pathogène est également possible, tels des virus, des bactéries⁴.

L'ADNe du Cachalot pygmée⁵ a été trouvé au large de la Colombie, où il n'était pas connu.

Il est également possible de s'intéresser à une communauté d'espèces, grâce au metabarcoding. Une étude a été menée sur des poissons en Méditerranée, dans un espace protégé⁶. Les résultats ont mis en évidence une plus grande diversité d'espèces plus grosses, avec une perte de diversité en petites espèces dans cet espace préservé.

Pour les petites espèces (ex : mollusques aquatiques) très diversifiées avec des différences morphologiques difficiles à détecter, la recherche d'ADN est nécessaire. L'ADNe permet leur détermination directement, basées sur des bases de référence fiables.

Il s'agit d'un outil accessible et utilisé par diverses structures telles que des institutions, gestionnaires, bureaux d'études, collectivités, etc. La méthode de prélèvement est simple, elle ne nécessite qu'une courte formation. Les échantillons prélevés sont alors transmis aux laboratoires qui analyseront ces prélèvements.

Les limites

La détection est plus ou moins facile selon les organismes recherchés. Elle fonctionne très bien sur les poissons, les amphibiens, les bivalves aquatiques, avec 95% de chances qu'ils ne soient pas présents s'ils ne sont pas détectés.

La technique est moins performante sur les crustacées, qui libèrent peu d'ADN dans le milieu, ou sur les mammifères terrestres, lorsque la détection se fait dans l'eau.

La direction : dans un cours d'eau, suivant le lieu de prélèvement, on n'a pas d'indication sur l'aval du point de prélèvement, ni sur la distance parcourue dans le courant du cours d'eau par l'ADN collecté.

La détermination : elle nécessite de bonnes bases de références pour que la signature génétique de chaque espèce soit fiable.

La méthode ne donne pas d'information sur l'état sanitaire, la structure des populations, ni son abondance. Mais des études avancent actuellement pour repousser ces limites, il est déjà possible de corrélérer le nombre de lectures de séquences d'ADN à la biomasse.

Pour le suivi de la biodiversité aquatique, l'ADNe permet de se donner une image de la biodiversité d'un espace protégé, d'une région, d'un territoire.

⁴ **Miaud, C et al.** (2019): eDNA Increases the Detectability of Ranavirus Infection in an Alpine Amphibian Population. *Viruses* Juin 6; 11(6). DOI: [10.3390/v11060526](https://doi.org/10.3390/v11060526)

⁵ **Juhel, J.-B. et al** (2021). Detection of the elusive Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) using environmental DNA at Malpelo island (Eastern Pacific, Colombia). *Ecology and Evolution*, Vol 11 (7): pages 2956-2962. <https://doi.org/10.1002/ece3.7057>

⁶ **Boulanger, E. et al** (2021) : Environmental DNA metabarcoding reveals and unpacks a biodiversity conservation paradox in Mediterranean marine reserves *Proc. Biol. Sci.*, 288(1949) :20210112. DOI : [10.1098/rspb.2021.0112](https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0112)

En 2017, un inventaire a été réalisé sur le fleuve Maroni en Guyane : 46 points ont été échantillonnés pour relever la répartition des espèces de vertébrés et poissons en fonction des pressions anthropiques. Cet inventaire a été réalisé à nouveau en 2021, sur 57 points en ajoutant les bivalves, les eucaryotes et les procaryotes. L'ensemble du vivant est ainsi balayé, avec une résolution taxonomique peu élevée, mais toutes les espèces présentes sont relevées, avec des zooms centrés sur des espèces patrimoniales ou indicatrices. Un suivi à long terme basé sur l'ADNe est mis en place sur le Maroni en Guyane.

Vigilife

Vigilife est une initiative qui réunira une communauté d'acteurs pour inventorier le vivant à large échelle, pour créer un réseau de surveillance et de monitoring.

Actuellement en cours de développement, cette plateforme d'animation de la communauté des acteurs devrait être mise en place dans les prochains mois. Passer des inventaires au suivi permet de s'appuyer sur des standards, avec une méthode répliquable et des résultats comparables dans le temps et dans l'espace, notamment pour le suivi écologique des milieux naturels et des populations.

L'ADNe couplé avec des méthodes d'inventaire plus traditionnelles et/ou des outils de spatialisation permet de travailler sur les pressions et les réponses à ces pressions.

L'objectif principal de Vigilife est de renforcer la connaissance et le suivi sur le long terme de la biodiversité dans les milieux naturels, afin d'être en mesure d'apporter des éléments pour des actions et des mesures de gestion adaptées aux enjeux et problématiques locales.

Il s'agit d'apporter aux acteurs des territoires des outils de mesure de l'état écologique des milieux, de conservation de certaines espèces.

Vigilife sera une interface collaborative, qui mettra en lien l'ensemble des acteurs qui souhaitent rejoindre l'initiative, qu'ils soient issus du monde académique ou porteurs d'enjeux, gestionnaires, aménageurs. Un secrétariat animera le réseau, pour favoriser la mise en lien et les échanges d'expériences. Il proposera un accompagnement, des formations, des services d'ingénierie en montage de projets et de recherche de financements. Il vise à apporter des services aux acteurs qui souhaitent développer la technologie de l'ADNe pour répondre à leurs enjeux de territoire.

Un objectif important est également de rapprocher le monde académique des acteurs et porteurs d'enjeux.

Questions

Seul l'ADNe des espèces présentes est-il détecté ?

L'ADNe de rhinocéros à poil laineux a été détecté sur des carottes de sol dans le permafrost russe. Cependant, la technique décrite ici s'intéresse essentiellement au vivant actuel. L'ADNe se dégrade très vite avec les UV, entre autres, et s'adsorbe sur des matières en suspension qui

sont filtrées. Ces particules sédimentent très vite, l'ADNe peut se préserver dans le lit de la rivière, mais les prélèvements sont effectués dans l'eau courante. En aquarium, le signal est perdu en 15 jours environ ; en conditions naturelles le délai est certainement beaucoup plus court car les particules se sédimentent. L'ADNe se dégrade très vite, notamment avec l'action des UV.

Quel coût ?

Il varie suivant les analyses réalisées.

Pour les amphibiens, il est d'environ 200€ par réplica, auquel s'ajoute 200€ par consommable (tubes stériles, filtre, etc.) Pour les bivalves, c'est plus élevé car il y a deux amorces. En incluant le temps passé, le coût moyen est autour de 1 000€ par site. Pour l'intégralité du vivant, comme cela a été réalisé sur le Maroni, en Guyane, on atteint 2 500€ par site.

Quid du « low cost » ?

Avec moins de réplica, on réduit les chances de trouver les espèces rares. Cela dépend des problématiques.

Quelle précision géographique ?

L'ADNe est transporté par l'eau. Au fur et à mesure des recherches, on observe que la distance de détection sur un fleuve ou une rivière est relativement faible, plutôt de l'ordre du kilomètre voir moins. L'ADNe peut dans l'absolu parcourir de grandes distances, mais en fait, il sédimente rapidement. Cette distance varie aussi en fonction de différents paramètres : le courant, la turbidité (qui retient davantage les particules dans l'eau et les UV y circulent moins) et la température (la dégradation est plus rapide sous les tropiques).

Quelle avancée de la recherche sur les aspects quantitatifs ?

Les résultats bruts donnent un nombre de lectures d'ADN dans l'échantillon. On peut estimer que ce nombre est corrélé à l'abondance de l'espèce dans le site. La méthodologie semble assez robuste.

Un biais existe : si un individu, une truite par exemple, est morte à l'endroit du prélèvement, la densité d'ADN sera très élevée. Si la densité de truite est très élevée vers la rive droite du cours d'eau et que le prélèvement est réalisé sur la rive gauche, on n'aura pas la densité exacte d'ADN sur le site. Ce biais peut être réduit en multipliant les prélèvements.

L'ADNe permet-il de détecter également les pathologies ?

C'est tout à fait possible. En principe, toutes les maladies peuvent être détectées, mais cela nécessite des développements spécifiques.

Le seuil de détectabilité varie-t-il d'une espèce à l'autre ?

De manière statistique, certaines espèces seraient moins facilement détectables, et ce n'est pas entièrement lié à la taille de l'espèce.

Pour le barbeau dans les cours d'eau des Cévennes, il n'est pas possible de différencier le barbeau fluviatile du barbeau méridional, mais des développements sont attendus.

Quelles structures participent à la préfiguration de la plateforme Vigilife ?

Un cercle resserré participe au montage de la plateforme collaborative. Un second cercle regroupe les acteurs partenaires, qui seraient prêts à rejoindre l'initiative dès qu'elle sera

lancée, et qui collaborent déjà entre eux. Dans les deux cercles, sont présents des structures académiques et des structures de porteurs d'enjeux : associations, gestionnaires, et autres types d'opérateurs du monde des entreprises. Un partenariat existe déjà avec Patrinat (MNHN/CNRS/OFB).

ADNe dans l'eau, mais aussi dans le sol ?

Cela marche aussi dans le sol, par carottage ; c'est très performant pour les champignons car le mycélium est très étendu. Pour les insectes, ou les mammifères, cela marche aussi, mais uniquement dans les sites prélevés, il faut donc augmenter significativement le nombre de prélèvements et avec des coûts plus élevés. Dans les cours d'eau, il y a un brassage dans lequel le niveau de dilution est optimal.

Que sait-on de l'état des bases de références nécessaires ?

Cela dépend des pays et des organismes. Pour la France, notamment sur les poissons de Guyane, les 350 espèces présentes ont toutes été séquencées.

En Guinée Bissau, sur 680 séquences de poissons, seules 25 peuvent être identifiées.

Il existe une banque de référence mondiale, Gene bank qui permet de compléter. Cependant, il y a entre 5 et 30% d'erreur dans la détermination des taxons dans Gene Bank. Exemple : dans les premiers séquençages du chimpanzé, les séquençages du chercheur qui l'a réalisé sont nombreux.

Ont participé à ce RDV #16

Alice Roth, Catherine Cibien, Anaïs Baude-Soares, Christine Hervé (MAB France), Benjamin Volloï, Cloé Provost (RB Iroise), Viviane Dargery (RB Luberon-Lure), Elisa, Virginie Gailly, Hélène Barré-Cardi (+ plusieurs personnes du CEN Corse), Julien Innocenzi (RB Falasorma Dui Sevi), Daniel Sylvestre, Marie Robert (RB Guadeloupe), Emilie Brès, Stéphan Garnier (RB Cévennes), Stéphanie Colle-Tamagna.

