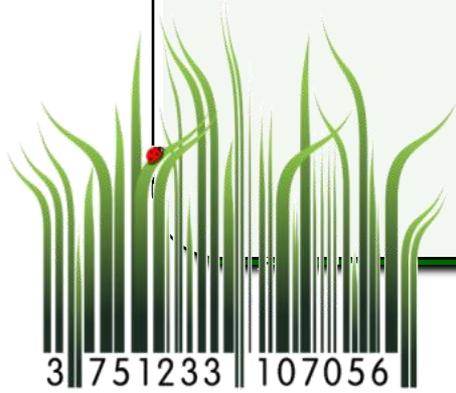
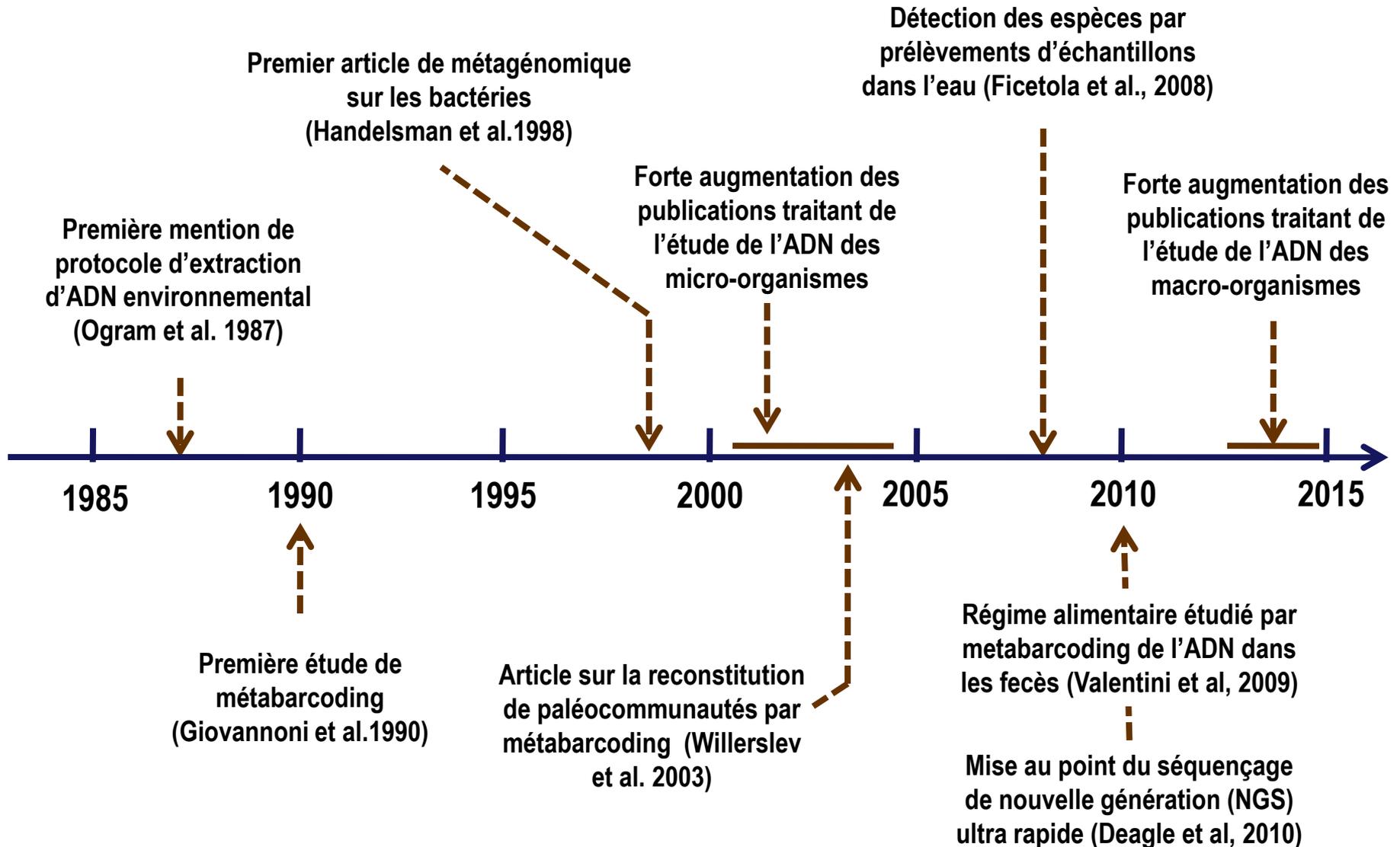


ADN environnemental & Metabarcoding



Un sujet récent, en pleine expansion

Un domaine très récent, évoluant à toute vitesse

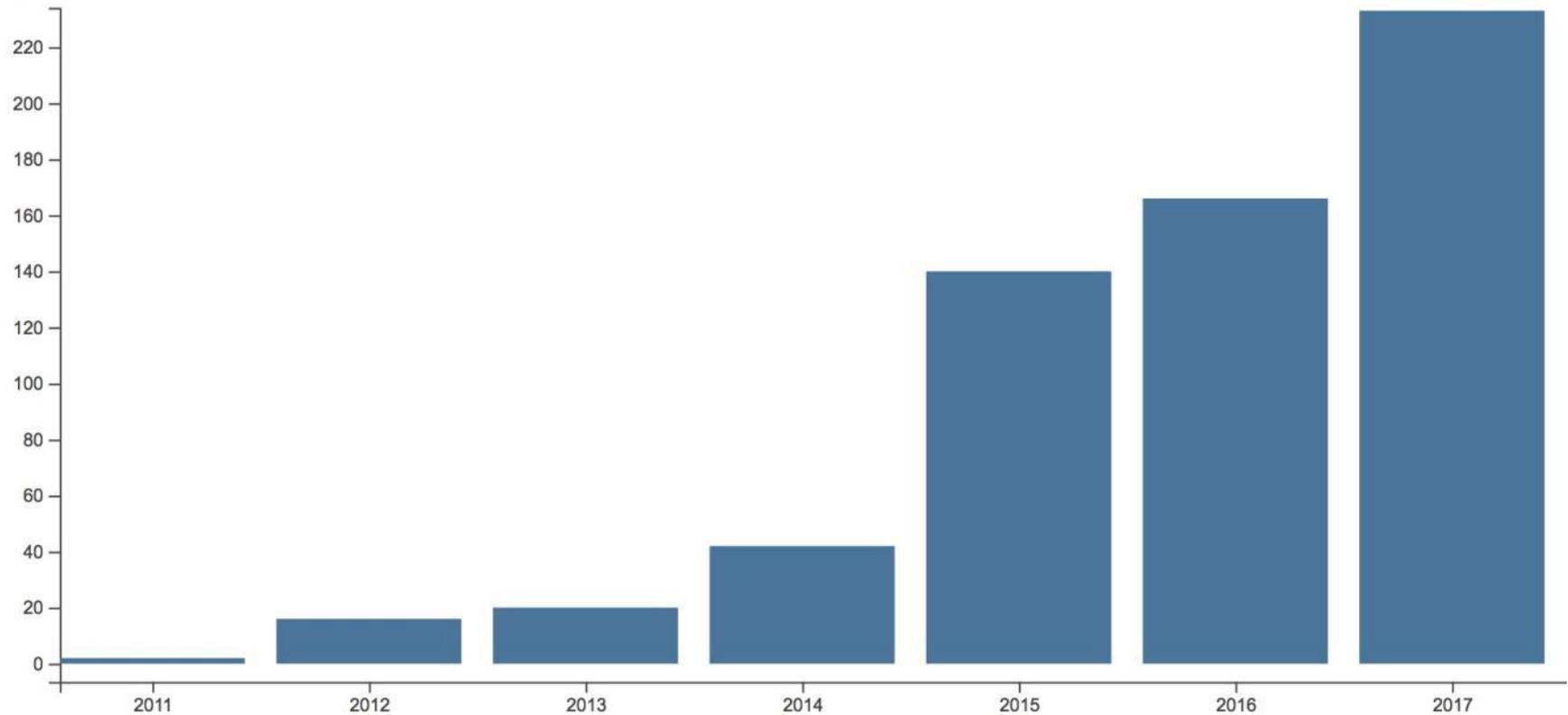


Un sujet en pleine expansion

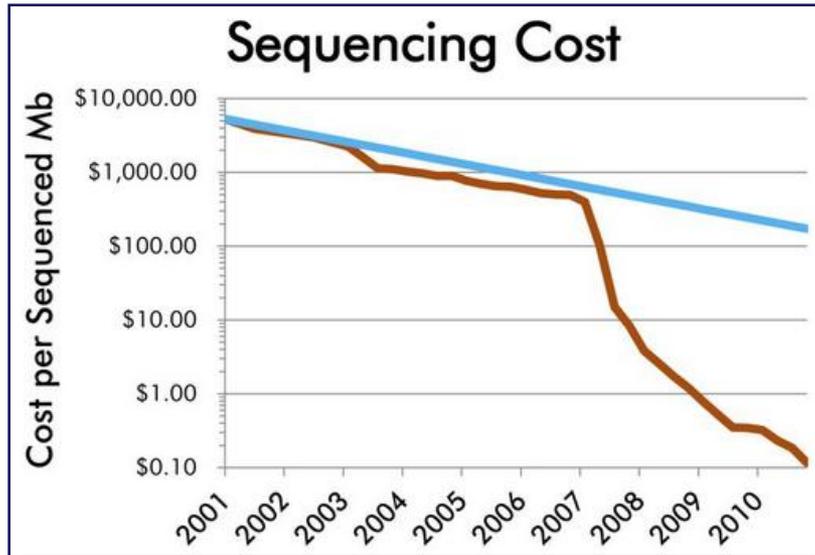
Nombre de publications traitant du métabarcoding

Total Publications

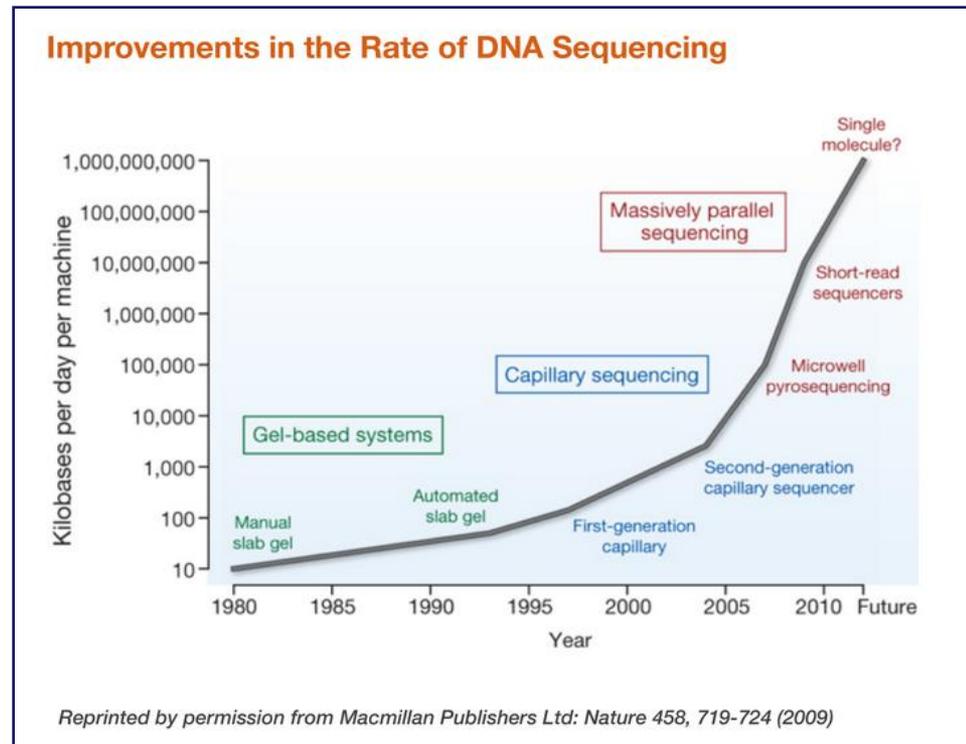
620



Un séquençage toujours moins cher et plus rapide



↑
genotyping-by-sequencing (GBS)



ADNe et Metabarcoding : les grands principes

ADN environnemental : 2 grands domaines

Indices comparés de biodiversité pour 19 métagénomes marins échantillonnés par l'expédition Global Ocean Sampling Expedition

échantillonnage sur le terrain

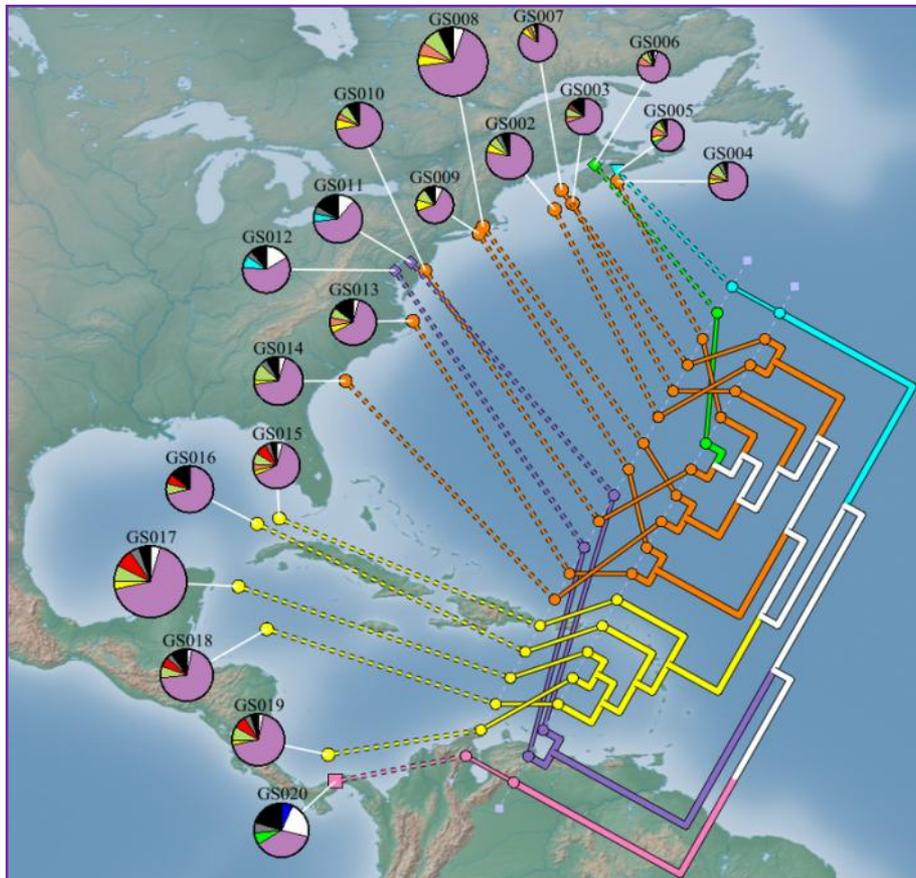
extraction de l'ADN

Séquençage de l'ADN

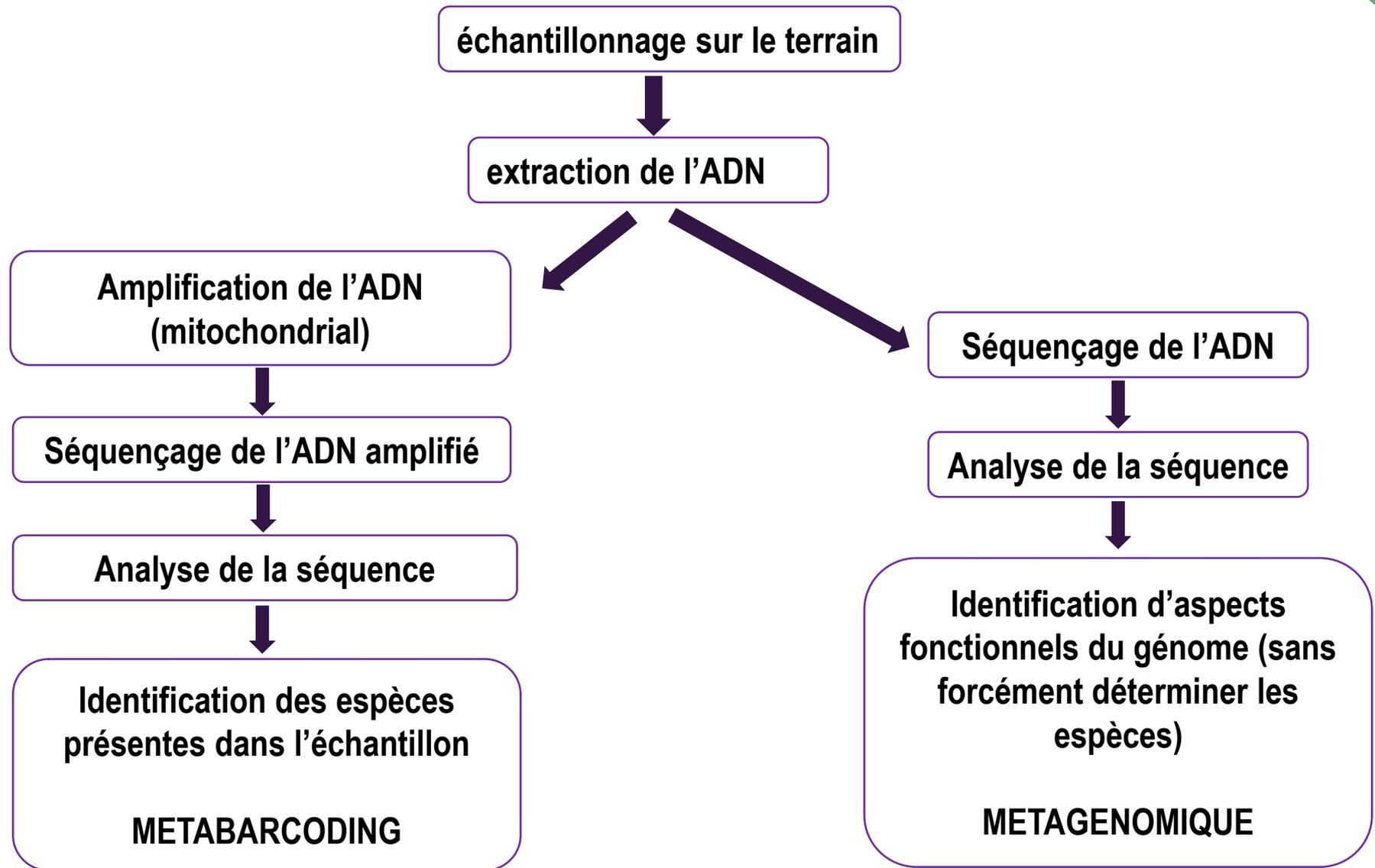
Analyse de la séquence

Identification d'aspects fonctionnels du génome (sans forcément déterminer les espèces)

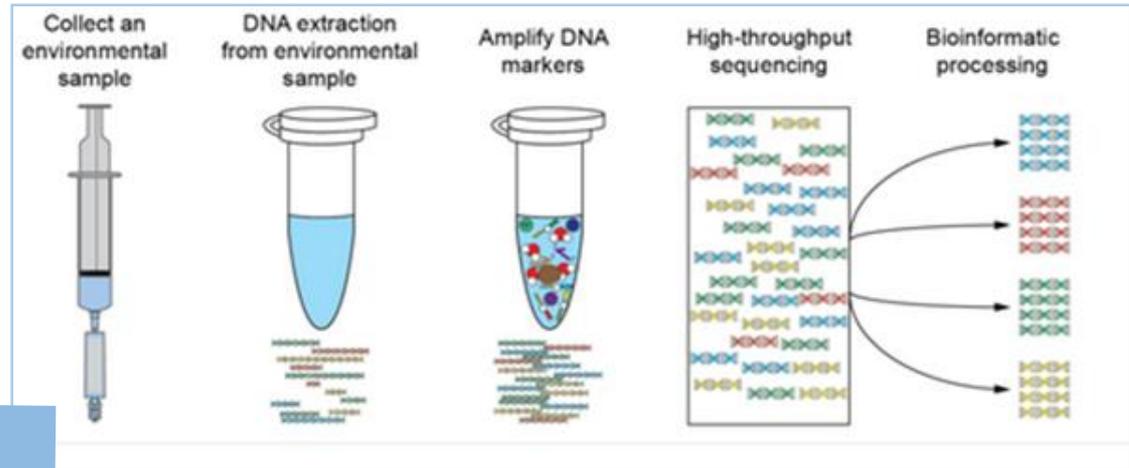
METAGENOMIQUE



ADN environnemental : 2 grands domaines



Les grandes étapes du métabarcoding



Collecte de spécimens
et/ou prélèvements
d'échantillons sur le terrain

Traitement de l'ADN
et séquençage

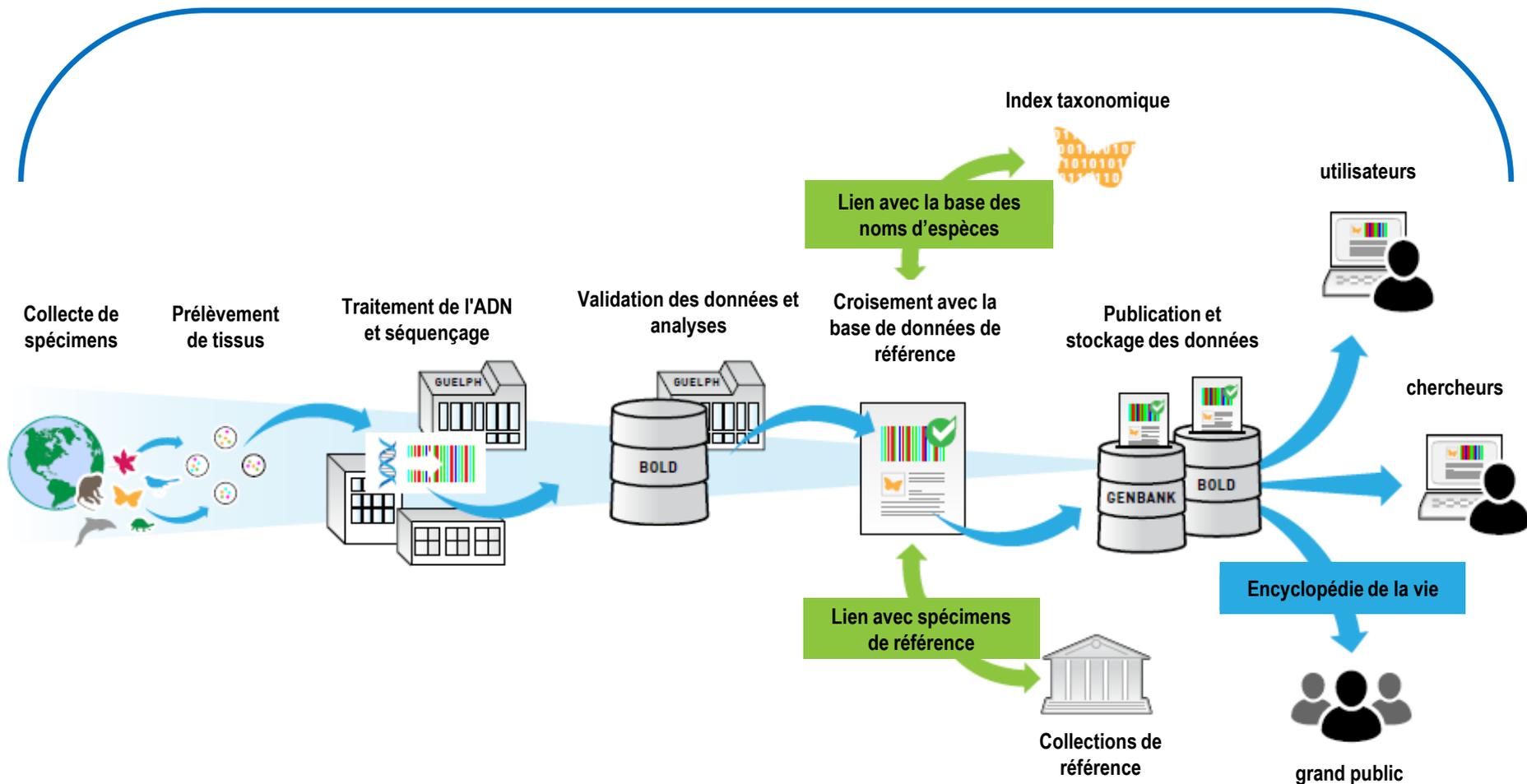
Validation des données et
analyses



Bold = barcode of life data

Les grandes étapes du métabarcoding

The « barcoding pipeline »

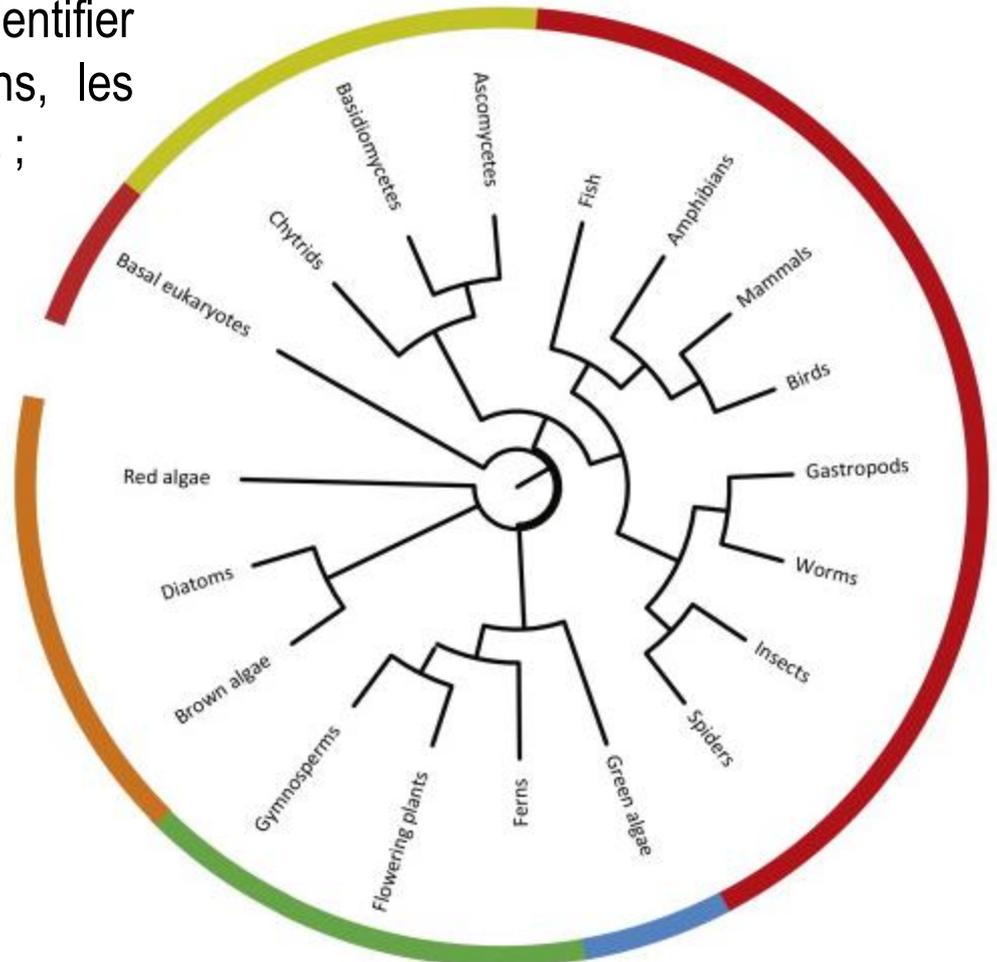


Bold = barcode of life data

Quel marqueur ADN choisir ?

- La région du gène qui est utilisée comme « code-barre standard » pour presque tous les groupes d'animaux est une région de 648 paires de bases dans le gène de la cytochrome ;
- Le CO1 s'avère très efficace pour identifier les oiseaux, les papillons, les poissons, les mouches et de nombreux autres groupes ;
- La COI évolue trop lentement dans les autres groupes et d'autres marqueurs doivent être choisis.

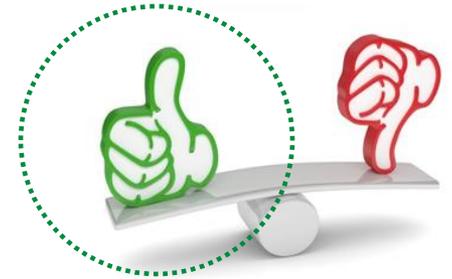
Key:	Color	Clade	Primary barcode(s)	Secondary barcode(s)
	Red	Animals	CO1	CO1, 16S
	Yellow	Fungi	ITS	LSU D1/D2
	Blue	Green algae	<i>tufA</i>	LSU D2/D3
	Green	Land plants	<i>rbcL/matK</i>	<i>psbA-trnH</i> /ITS
	Orange	Algae	CO1-5P	LSU D2/D3



Metabarcoding : de nombreux avantages

Des avantages certains :

- ✓ méthode non invasive
- ✓ coûts réduits
- ✓ capacité de détection +/- accrue

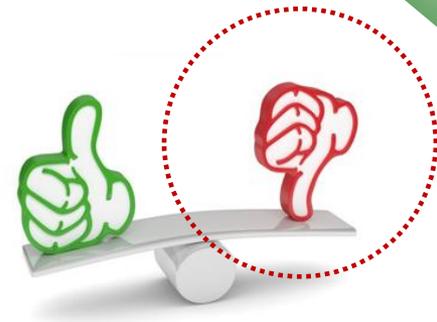


permettant de multiples utilisations :

- aide à la conservation des espèces rares
- inventaire des espèces en milieux difficiles
- inventaire des espèces difficiles à déterminer (y compris stades larvaires)
- meilleure connaissance des relations prédateurs – proies, de l'écologie des communautés, de la relations hôtes – parasites, pathogènes
- détection et suivi des espèces invasives
- évaluation de la qualité écologique des milieux
- suivi de la modification des aires de distributions
- ...

Metabarcoding : des limites (sans cesse repoussées)

ADNe + metabarcoding ne sont pas sans défaut :



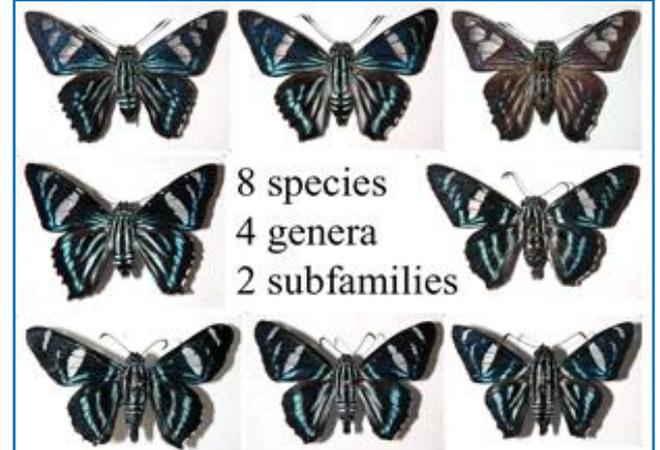
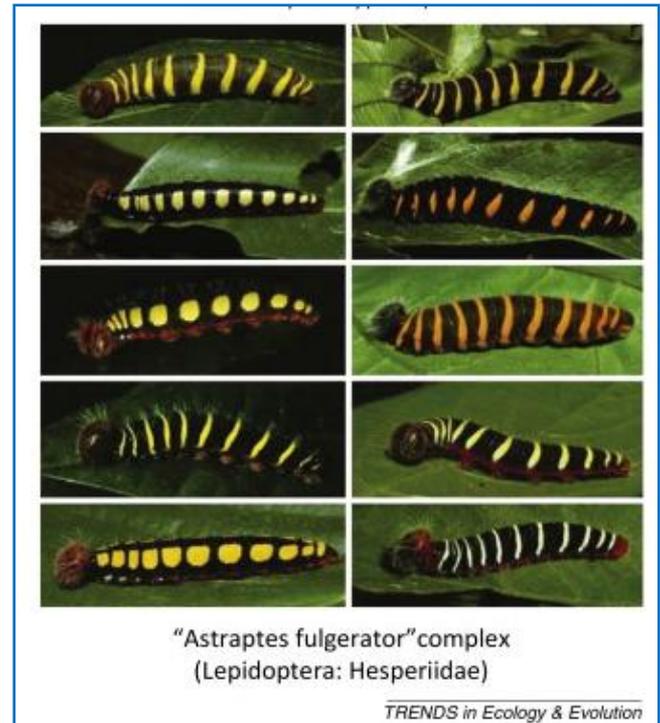
- Seulement présence / absence des espèces ;
- Pas de connaissances des stades de développement des organismes ni de l'état des populations ;
- Pas de connaissance de l'abondance absolue (mais des résultats convergents montrant la possibilité de décrire les abondances relatives) ;
- Base de référence encore incomplète ;
- Besoin de marqueurs complémentaires ;
- Détectabilité et efficacité de la méthode varient selon les groupes et les milieux ;
- Présence d'ADN ne signifiant pas toujours présence d'organisme (conditions hydrauliques, eaux usées, présence passée récente, proies ingérées...).

GÉNÉTIQUE & DESCRIPTION DE NOUVELLES ESPÈCES

métabarcoding et espèces cryptiques

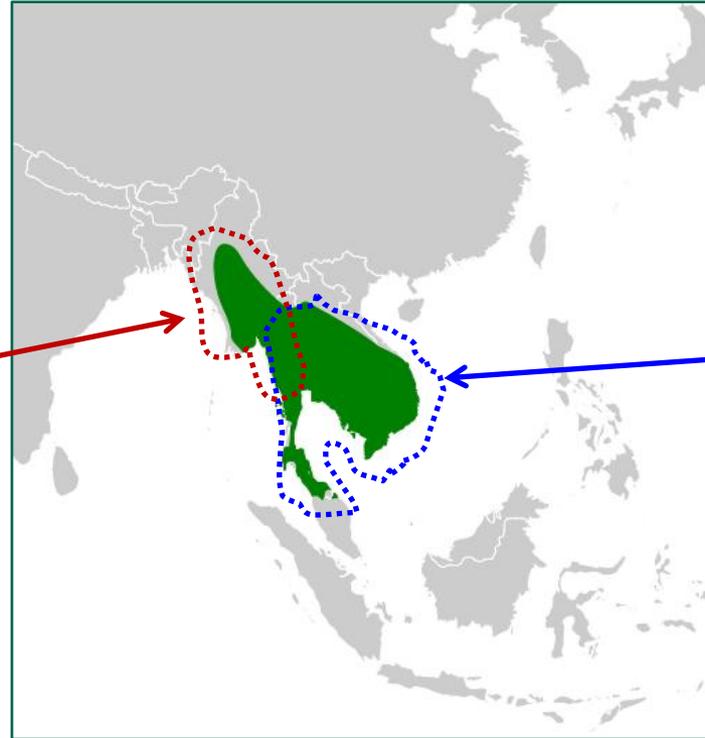
- Le métabarcoding est un outil génétique précieux pour révéler des espèces cryptiques ;
- Lorsqu'ils sont combinés avec des données écologiques, les « codes barres de l'ADN » fournissent des preuves supplémentaires pour déterminer des espèces ;
- Le complexe *Astraptes fulgerator* est un exemple classique de l'utilisation des codes-barres.

Dans le parc de Guanacaste (Costa Rica), la combinaison : codes barres ADN + plantes hôtes + morphologie larvaire révèle 10 espèces là où l'on en décrivait une seule auparavant

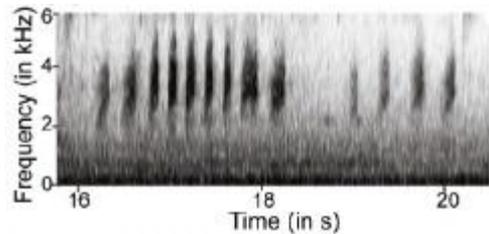


L'apport de la génétique (ex. des oiseaux)

2016



Pycnonotus blanfordi blanfordi

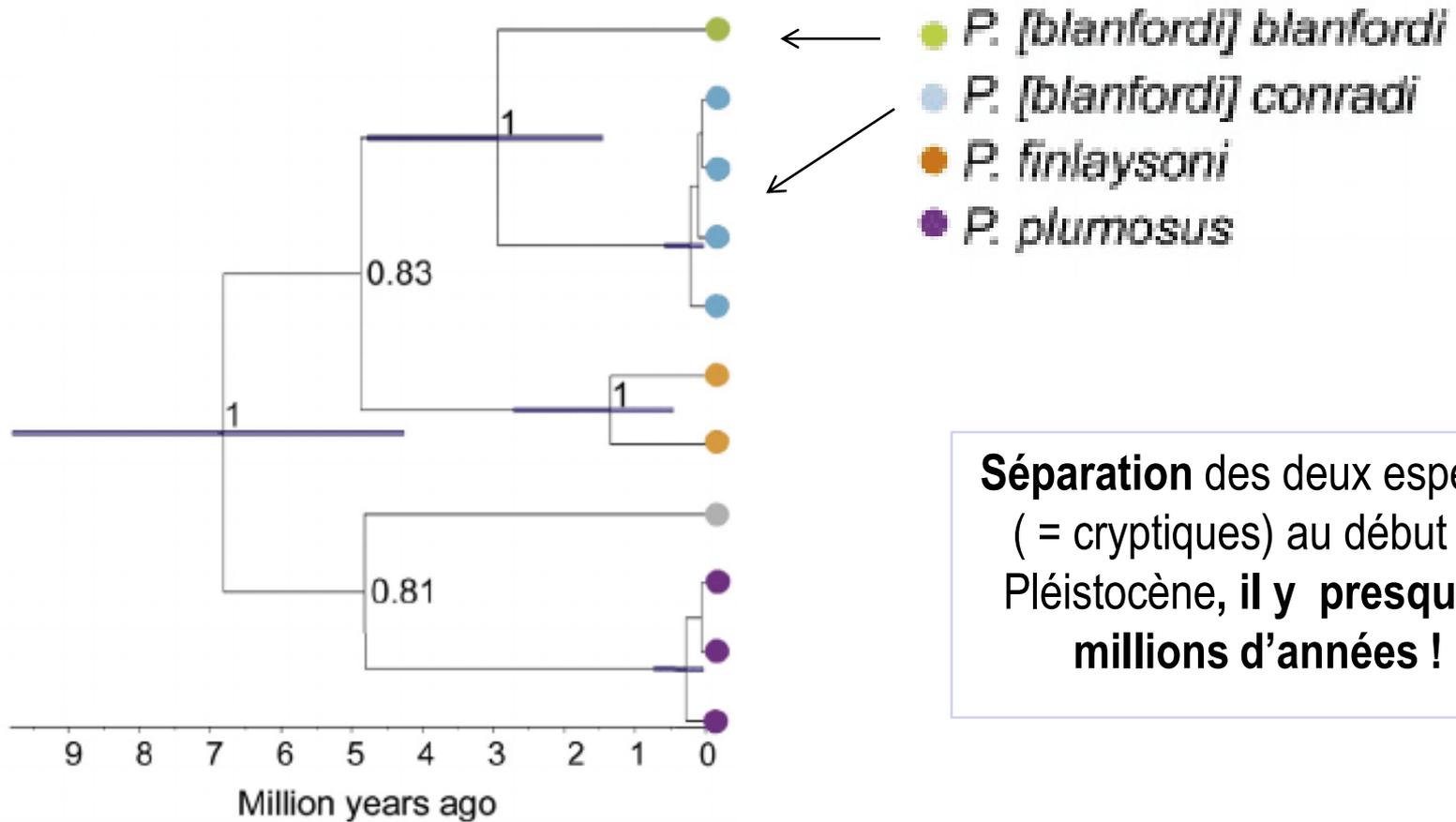


Pycnonotus blanfordi conradi

Les deux sous-espèces sont confirmées par des critères
physionomiques et bioacoustiques similaires

L'apport de la génétique (ex. des oiseaux)

2016

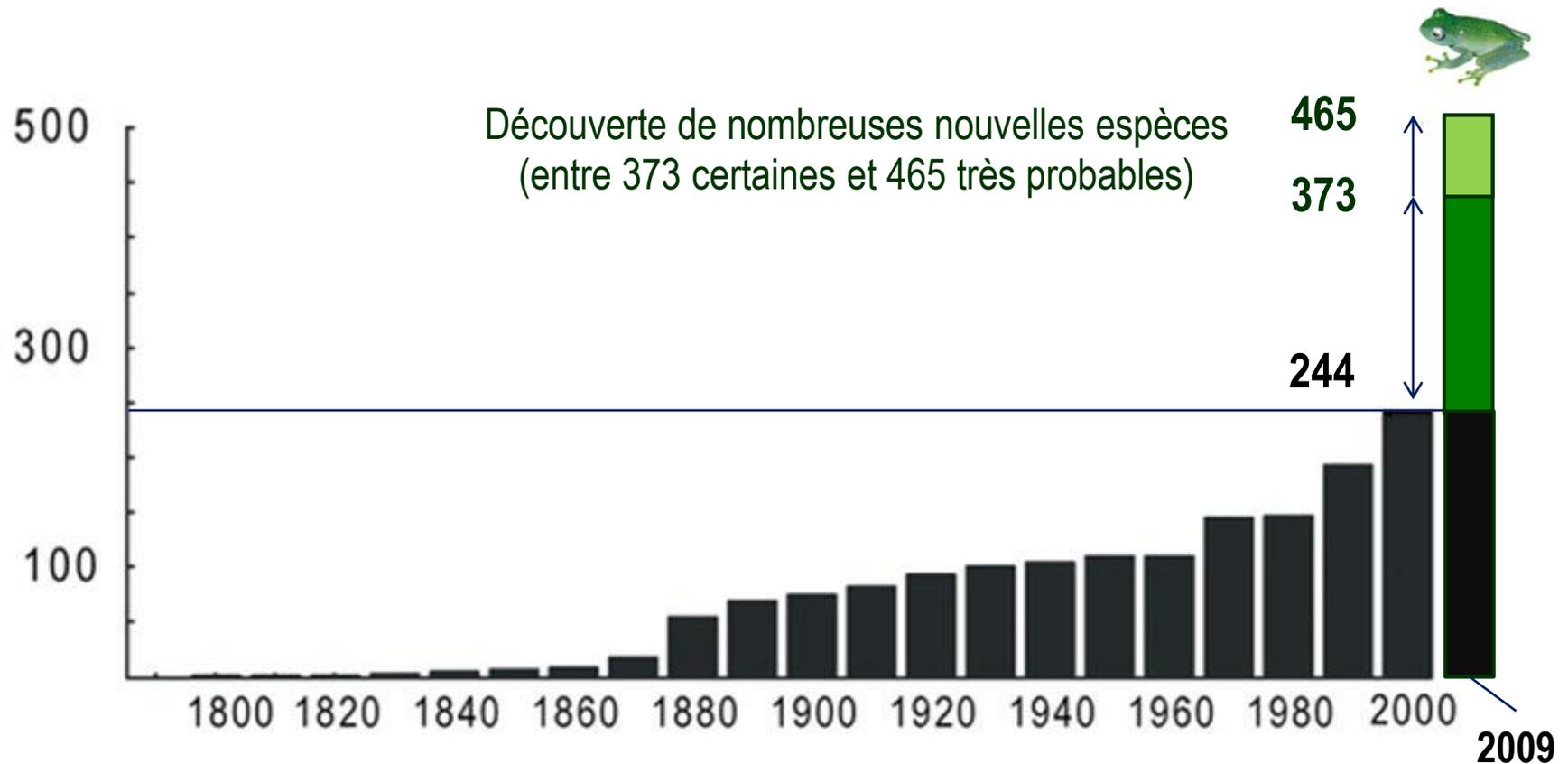


Séparation des deux espèces
(= cryptiques) au début du
Pléistocène, il y **presque 3**
millions d'années !

L'apport de la génétique (ex. des amphibiens)

2009

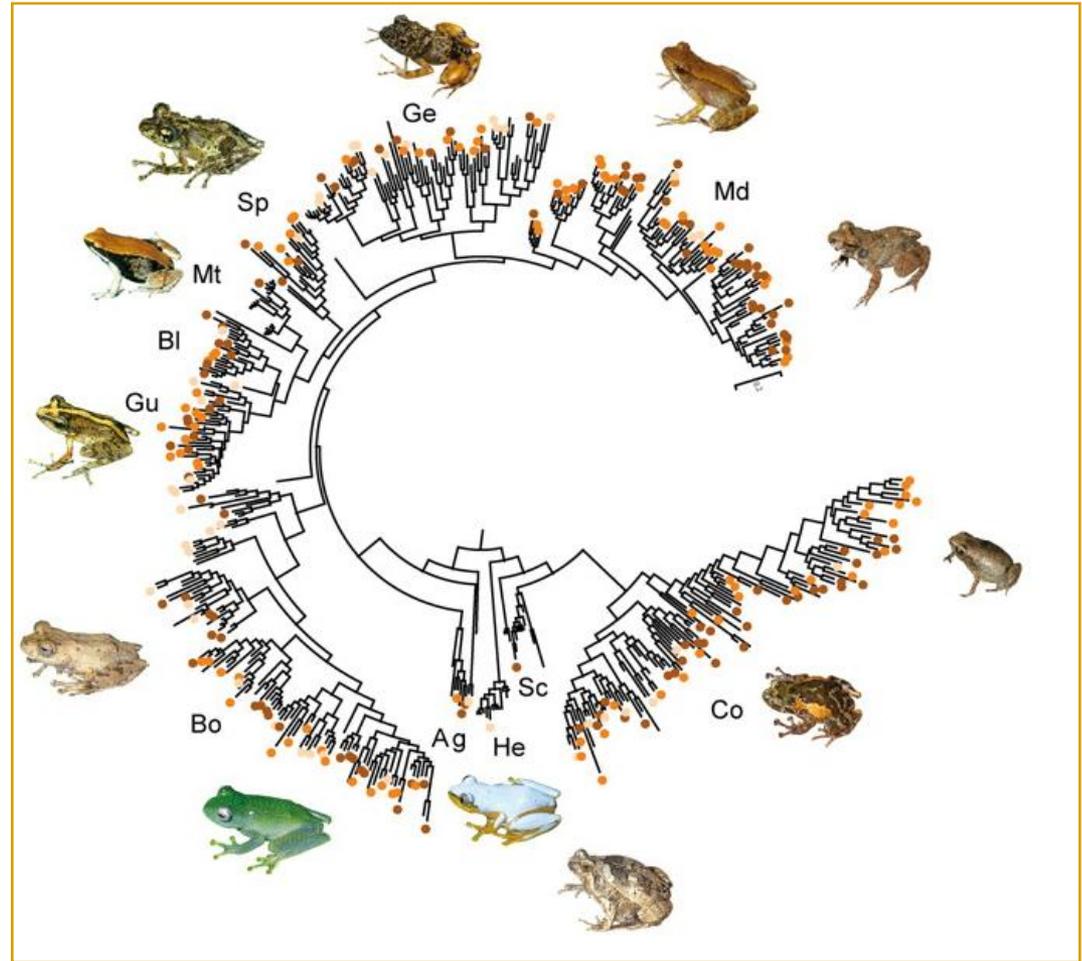
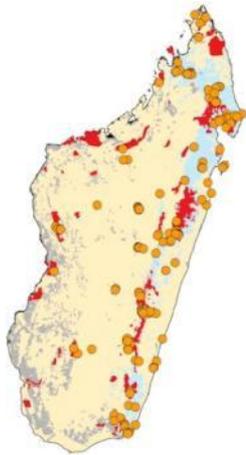
Madagascar :
étude génétique de 2850 individus prélevés dans 170 localités



L'apport de la génétique (ex. des amphibiens)

2009

- Les nouvelles espèces découvertes ne sont pas localisées ni géographiquement ni dans l'arbre taxonomique mais réparties sur tout le territoire et dans tous les sous-groupes.



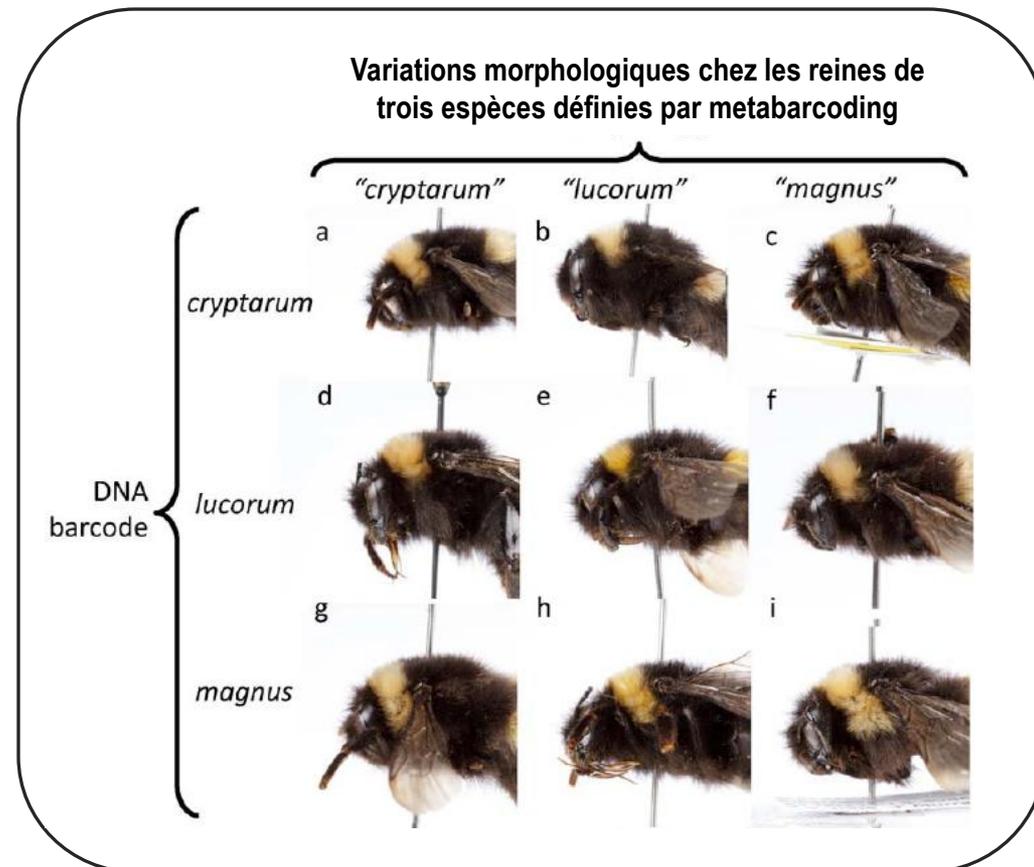
« la diversité des amphibiens tropicaux dans le monde est probablement sous-estimée à un niveau sans précédent. Cela plaide pour les enquêtes taxonomiques intégrées comme base pour établir les priorités des efforts de conservation dans les points chauds de la biodiversité. »

Metabarcoding et espèces cryptiques de bourdons

Colour patterns do not diagnose species : quantitative evaluation of a DNA barcoded cryptic Bumblebee complex



- Le complexe *B. lucorum* (*Bombus lucorum*, *Bombus cryptarum*, *Bombus magnus*) est l'un des groupes le plus abondant et le plus important de pollinisateurs en Europe du Nord ;
- Il était admis que les reines étaient très faciles à identifier à partir de caractères morphologiques ;
- L'ADN infirme totalement cette possibilité (continuum de couleurs).



Metabarcoding et espèces cryptiques

- Etude visant à déterminer l'impact sur les amphibiens de la construction d'une route dans le parc national de Moukalaba-Doudou (Gabon)

- 48 espèces visuellement décrites seront potentiellement impactées ;

- Mais une fois « barcodées », ces 48 espèces se révèlent être en fait au nombre de ...

28 !

- Cela permet d'éviter l'octroi de financement sur des sujets avec des enjeux faibles à nuls.



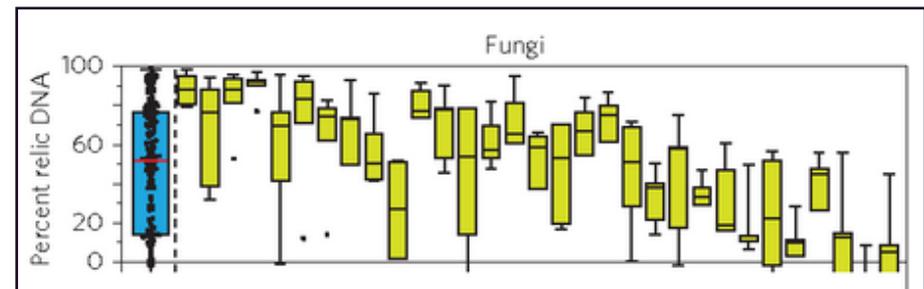
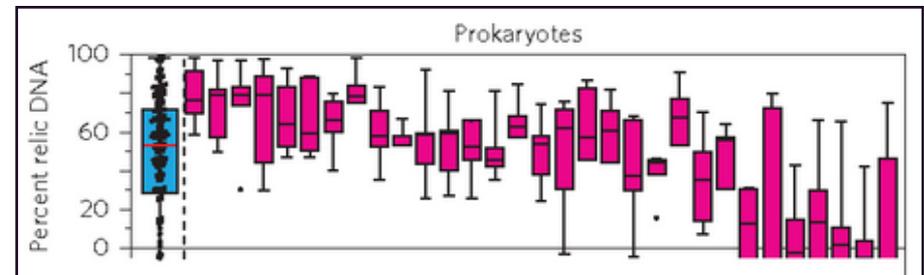
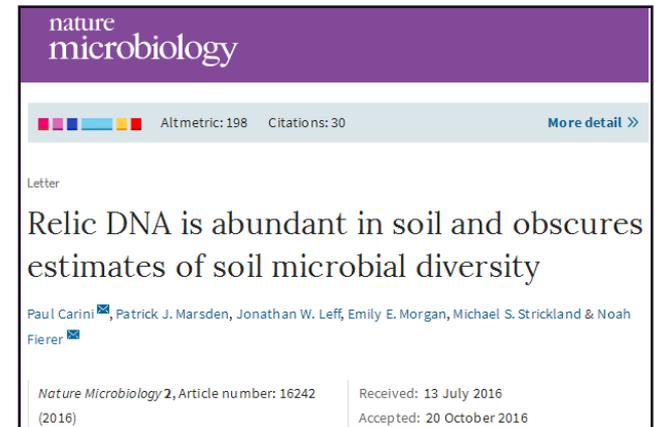
9 espèces ? Non, une seule mise en évidence grâce au metabarcoding : Phrynobatrachus auritus

La génétique ne fait pas tout...

- On suppose implicitement que l'ADN mesuré dans les sols est vivant.
- Etude utilisant la PCR de viabilité basée sur le colorant d'intercalation d'ADN photoréactif nommé propidium monoazide...

■ L'ADN extracellulaire des micro-organismes morts s'avère pouvoir persister dans le sol pendant des semaines à des années, surtout dans les sols pauvres en calcaire

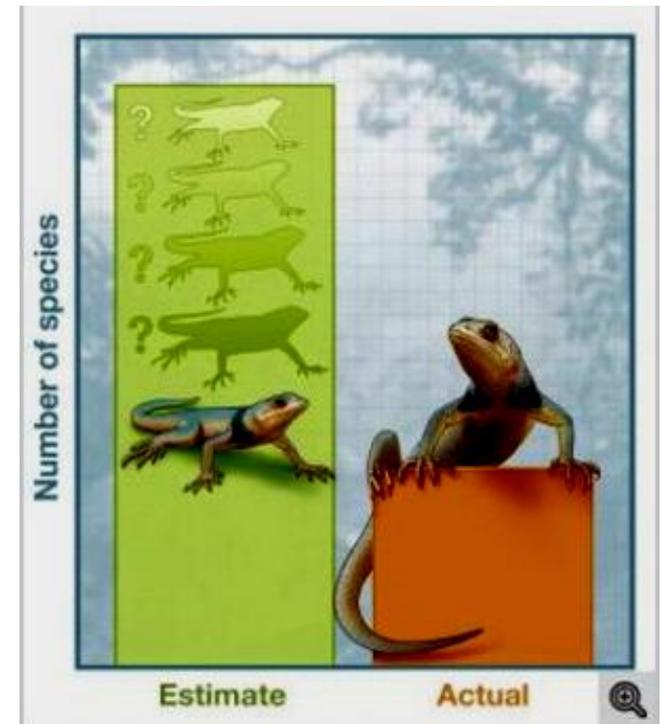
■ « *L'ADN relique gonfle la diversité procaryote et fongique observée dans les sols jusqu'à 55 %* »



La génétique ne fait pas tout

Etude de deux biologistes évolutionnistes sur les méthodes ADN de description de nouvelles espèces de reptiles

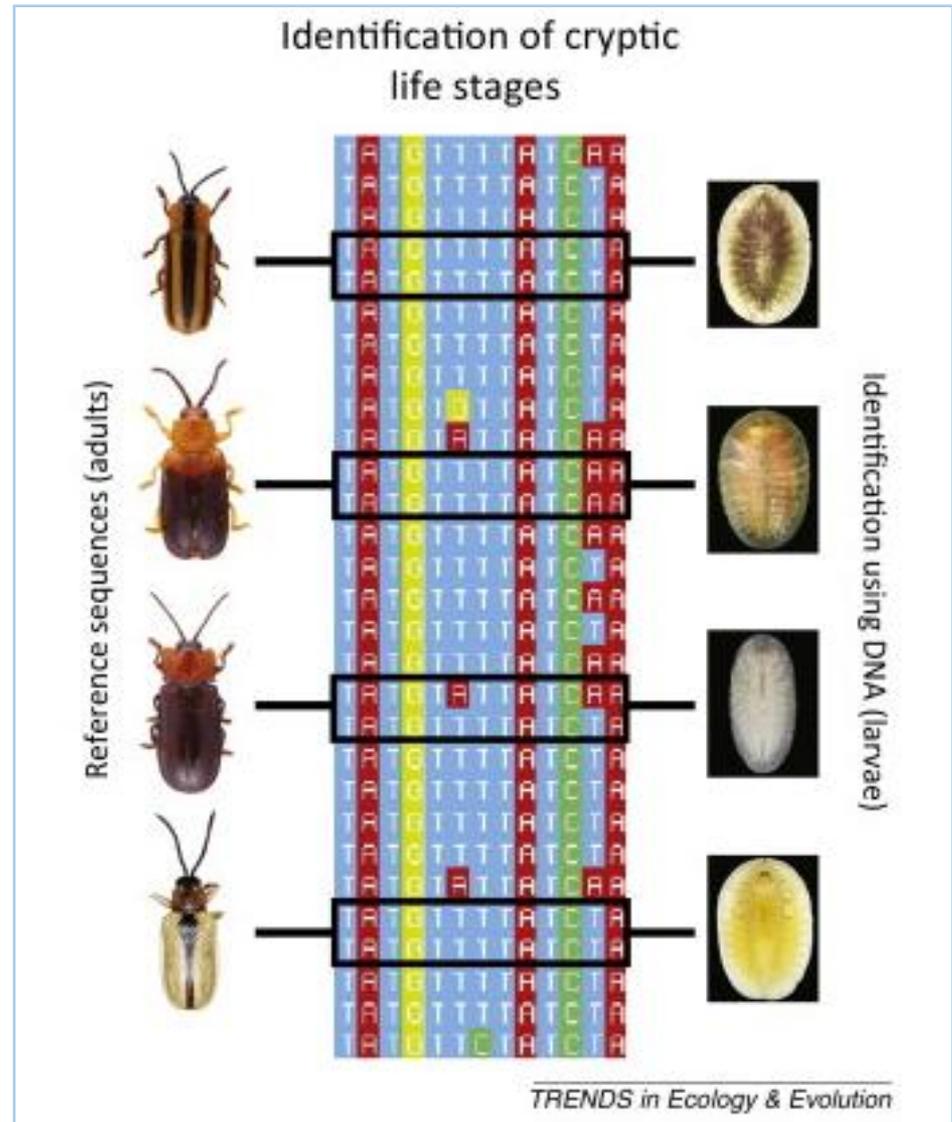
- « *Il s'agit d'un domaine qui a vraiment pris son envol au cours de la dernière décennie. Superficiellement, la génomique ressemble à une panacée parce que c'est très rapide et ne nécessite aucune expertise taxonomique* » Beyoncé, Michigan University
- « *Tout d'un coup, c'était comme il y avait un remède miracle. Vous avez juste à appuyer sur un bouton et vous obtenez votre espèce. Beaucoup de gens se laisser emporter.* » Sukumaran, Michigan University
- **Résultat : l'approche génétique (anciennement appelé modèle coalescent) peut conduire à des estimations d'espèces qui sont 5 à 13 fois plus élevées que le véritable nombre.**



Metabarcoding et stades de développement des espèces

Reconnaitre des espèces au stade larvaire

- Un défi pour les taxonomistes est d'associer les stades de vie immatures à leurs formes adultes ;
- On recourt alors de plus en plus aux codes barres ADN pour les œufs, et les larves chez les insectes ;
- Exemple au Costa Rica d'une forêt pré-montagneuse tropicale : mise au point d'une base de données complète des codes barres ADN des coléoptères du genre *Chelobasis* à partir de tissus d'adultes. Puis identification rapide de tous les stades immatures de ces espèces.

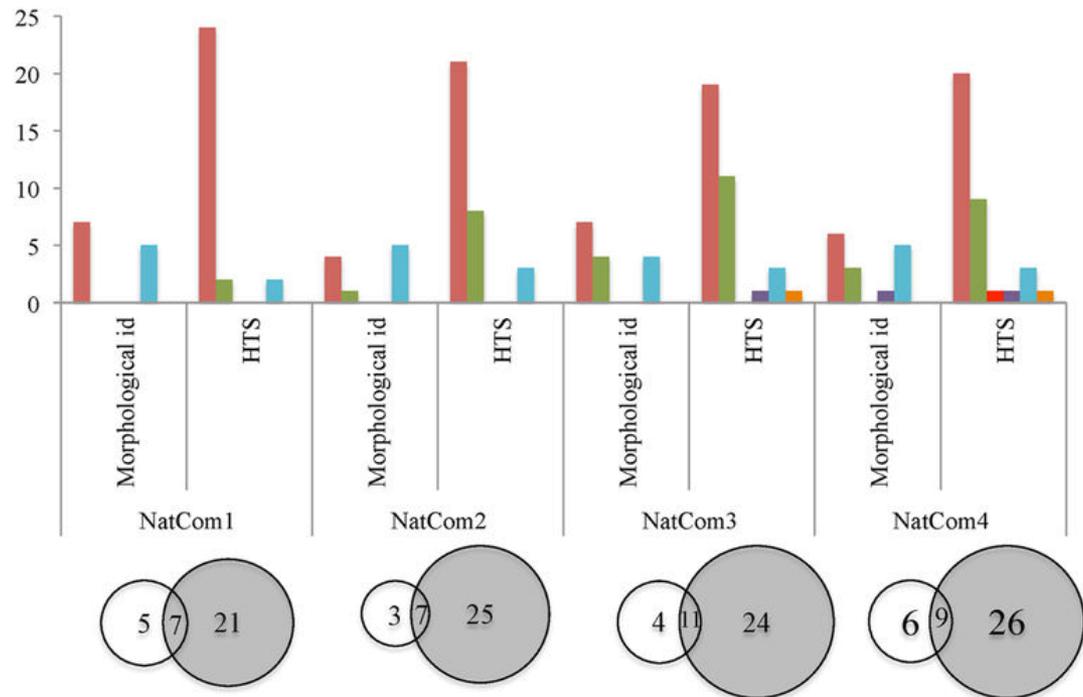


Metabarcoding et détection des espèces

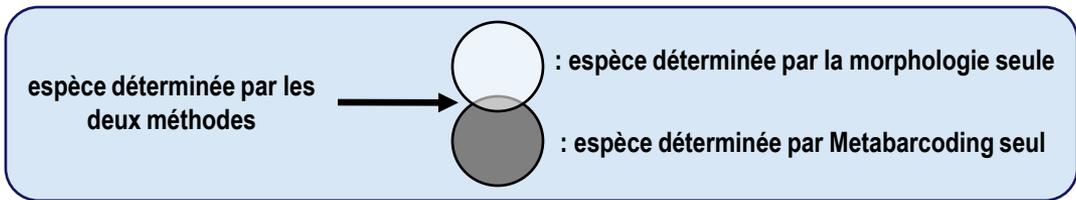
Metabarcoding versus détermination morphologique

Comparaison d'identifications d'espèces par morphologie et métabarcoding dans 4 communautés macrobenthiques estuariennes

- Annelida
- Arthropoda
- Bryozoa
- Echinodermata
- Mollusca
- Nemertea

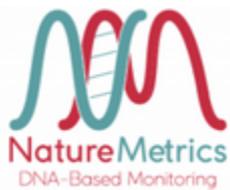


estuaire du Sado, Portugal



Metabarcoding et écologie

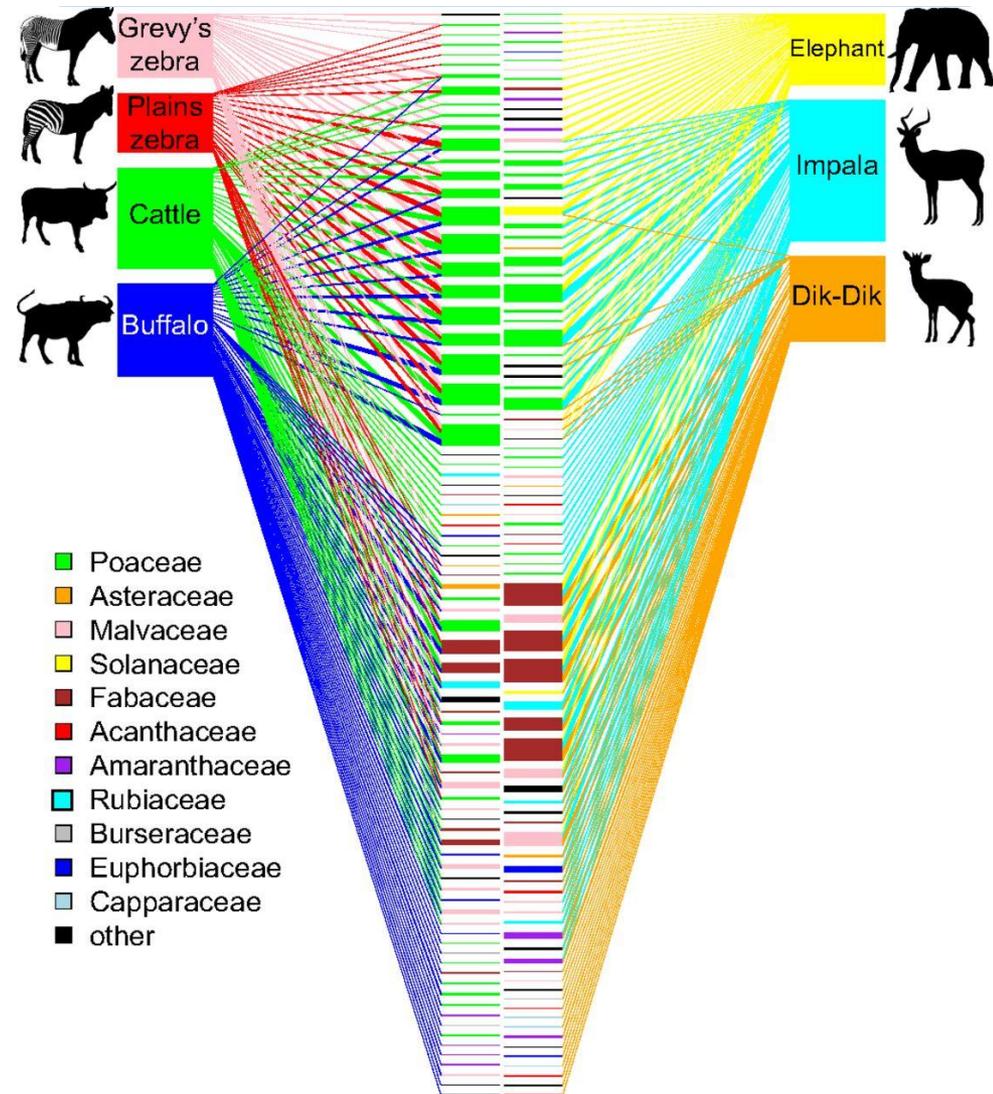
ADNe et régime alimentaire du Murin de Bechstein



		1	2	3	4	5	6	7	8
Bechstein's bat (<i>Myotis bechsteini</i>)		●	●	●	●	●	●	●	●
Common Oak midget moth (<i>Phyllonorycter quercifoliella</i>)									○
Dun-bar moth (<i>Cosmia trapezina</i>)				○					
Engrailed moth (<i>Ectropis crepuscularia</i>)			○					○	
Green silver-lines moth (<i>Pseudoips prasinana</i>)			○						
Pale oak beauty moth (<i>Hypomecis punctinalis</i>)									○
Straw underwing moth (<i>Thalophila matura</i>)		○							
Crane fly (<i>Molophilus occultus</i>)									○
Crane fly (<i>Nephrotoma</i> sp.)		○	○						
Harvestman (<i>Leiobunum rotundum</i>)					○				
Acari mite sp.									○
Fly (<i>Pegoplatia infirma</i>)									○
Ant (<i>Myrmica ruginodis</i>)		○			○		○		○
Oak bush cricket (<i>Meconema thalassinum</i>)					○	○			
Speckled bush-cricket (<i>Leptophyes punctatissima</i>)			○						
Common earwig (<i>Forficula auricularia</i>)			○	○	○	○	○		○
Darkling beetle (<i>Prionychus ater</i>)							○		
Click beetle (<i>Stenagostus rhombeus</i>)								○	
Proturan (<i>Fujientomon dicestum</i>)		○		○			○	○	○
Earthworm (<i>Allolobophoridaella eiseni</i>)		○							

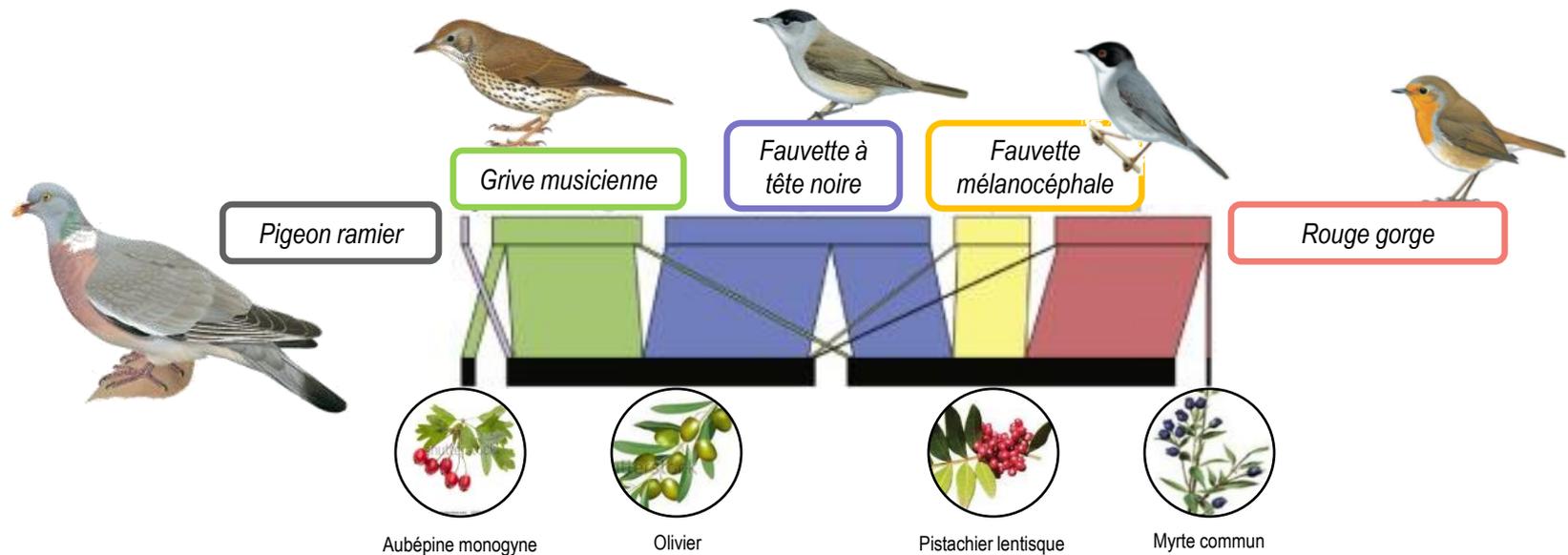
Métabarcoding et prédation

- De nouvelles techniques moléculaires sur les codes-barres ADN permettent d'étudier les interactions dans des réseaux complexes d'espèces ;
- A la station biologique de La Selva (Costa Rica) on a ainsi réussi à déterminer l'ensemble des interactions entre les plantes de l'ordre de Zingiberales et les chrysomèles herbivores.
- Ces techniques moléculaires présentent un immense potentiel pour une compréhension détaillée des interactions plantes-herbivores.



Métabarcoding et zoochorie

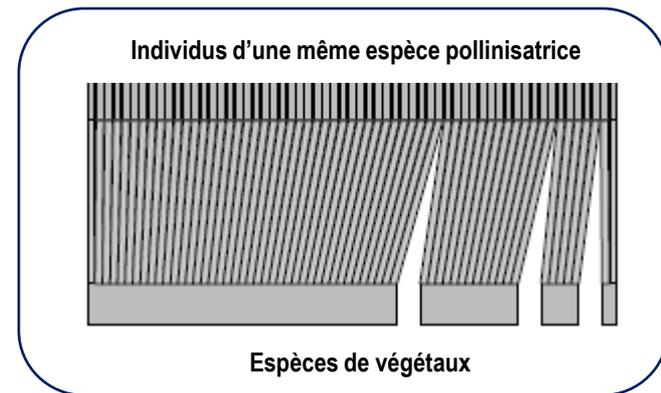
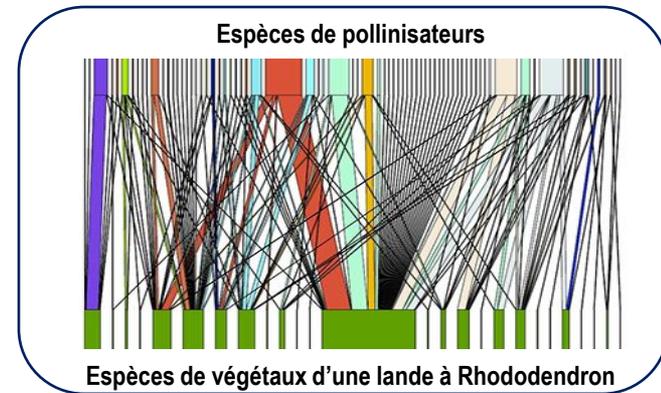
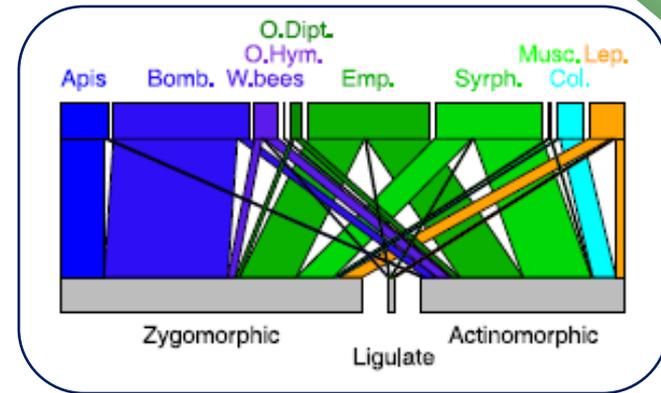
- Garrapilos (Espagne) : étude de la dispersion des graines par les oiseaux à l'aide d'une nouvelle technique de barcoding.
- Mise au point de mini-codes-barres pour amplifier l'ADN dégradé à partir des propagules déféquées.



- Les données recueillies constituent une opportunité unique pour comprendre le processus de sélection des fruits par les frugivores et la dispersion des graines.

Métabarcoding et pollinisateurs

- Etude innovante des réseaux de pollinisations par métabarcoding des charges polliniques de plus de 400 insectes capturés dans les Pyrénées ;
- 3 types d'interactions sont étudiées :
 - entre groupes fonctionnels de plantes et de pollinisateurs
 - entre espèces de plantes et pollinisateurs,
 - entre individus d'insectes et espèces de plantes.
- Les deux premières études confirment +/- les études classiques.
- Découverte clef : les individus sont très spécialisés sur différentes taxa de plantes, beaucoup plus que leur propre espèce (d'où efficacité accrue de la pollinisation).



Metabarcoding et champignons

- Les champignons sont de très bons indicateurs des conditions écologiques d'un milieu, mais ils sont souvent visibles de façon aléatoire ;
- Les « *CHEGD fungi* » (*Clavariaceae*, *Hygrophoraceae*, *Entolomataceae*, *Geoglossasseae*, *Dermolomataceae*) caractérisent les communautés des pelouses oligotrophes et permettent d'estimer leur valeur patrimoniale ;
- La France (Pr. Jean-Marc Lo Guidice & Pr. Jean-Louis Hemptin) a lancé un grand programme de recherche (2017 à 2022) : « ***Du metabarcoding à la gestion de l'environnement : une étude multidisciplinaire des communautés hyper-diverses de champignons*** » ;

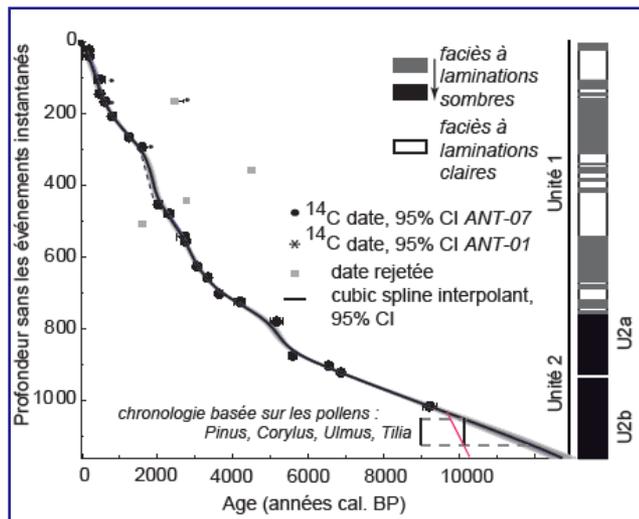


Extrait : « Ce projet novateur (...) vise à identifier, comprendre et utiliser les communautés fongiques hyperdiverses afin de développer leur potentiel de bioindication et de suivi de la gestion et de la santé des milieux naturels (...). La biologie moléculaire offre aujourd'hui des moyens efficaces de détecter la présence de ces communautés **en passant les contraintes techniques des inventaires de terrain** (saisonnalité, météorologie, grande variabilité d'apparition des carpophores, formation de l'observateur...) »

Metabarcoding et histoire des territoires

Métabarcoding et histoire des territoires

- 2015 : Etude de l'ADN sédimentaire lacustre pour reconstituer l'histoire des activités agricoles et des paysages (ADN des plantes et des mammifères) dans les Alpes françaises ;



- Résultats exploitables en raison de la corrélation entre la profondeur des prélèvements et l'âge des échantillons ;

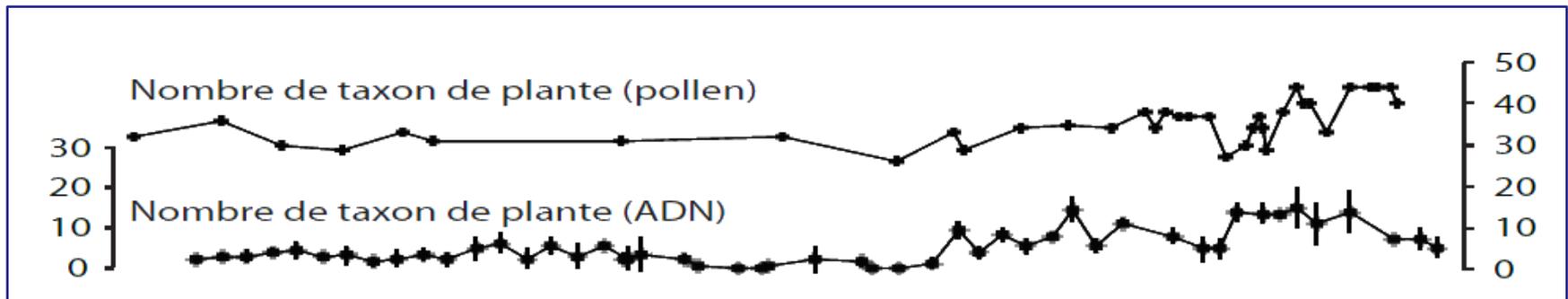
- Pour ne pas surestimer l'ADN intracellulaire des fossiles, analyse de l'ADN extracellulaire adsorbé (argiles, complexes organo-minéraux, substances humiques, sables). Cela protège ces molécules de la dégradation par les nucléases notamment bactériennes (Coolen et Overmann, 2007 ; Pietramellara et al., 2009).

Palynologie et/ou métabarcoding ?



Comparaison entre les analyses
polliniques et par métabarcoding des
sédiments du lac de La Thuile

(massif des Bauges, 874 m d'altitude)



- plus d'espèces détectées par l'analyse des pollens, mais les pollens voyagent de plus loin que les sédiments...
- actuellement on détermine encore (pas toujours !) plus précisément les espèces avec la palynologie (problème d'amorce pour l'ADN ?).

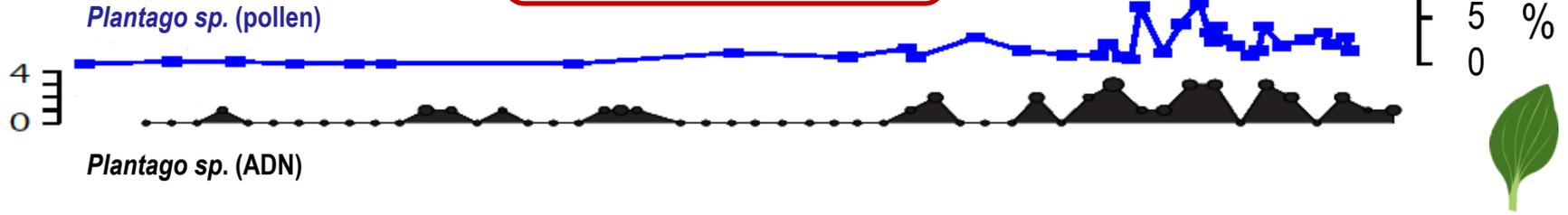
Palynologie et/ou métabarcoding ?

Comparaison entre les analyses polliniques et par métabarcoding des **sédiments du lac de La Thuile**

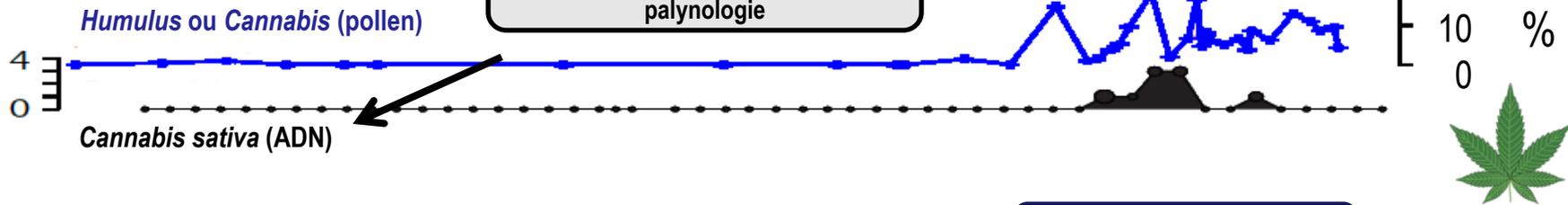
(massif des Bauges, 874 m d'altitude)

Nombre de PCR où les taxons ont été détectés

Palynologie et métabarcoding sont similaires pour petites espèces avec peu de déplacement de pollen

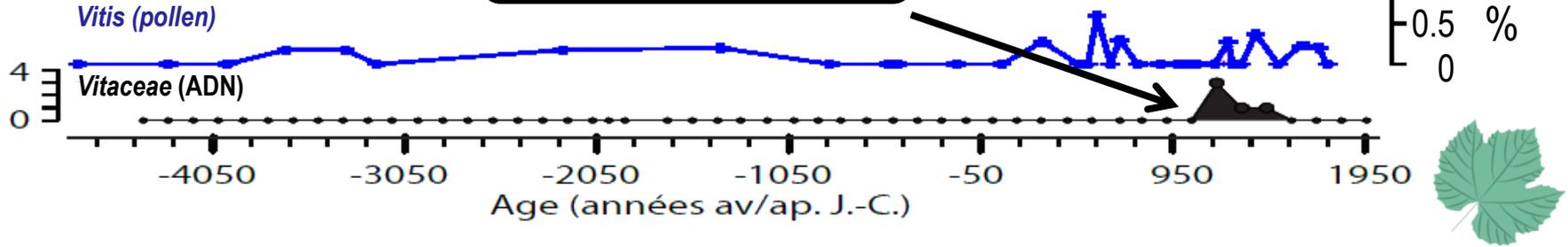


Le métabarcoding est parfois (rarement) plus précis que la palynologie



Activité viticole sur le bassin versant direct (optimal médiéval)

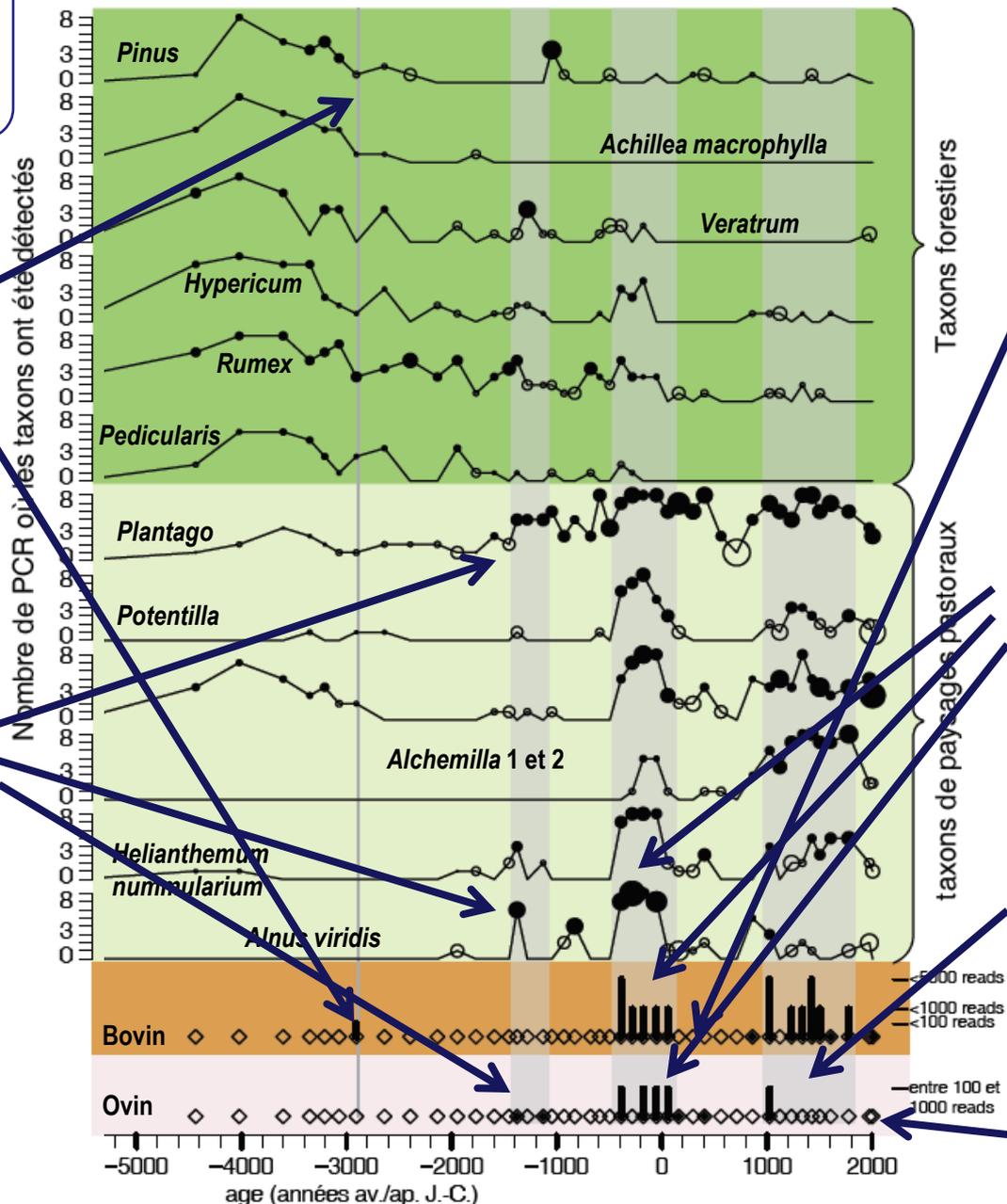
Activité viticole régionale



Histoire du lac d'Anterne par métabarcoding

Fin du Néolithique : chute des pins + ADN de vache, première activité d'élevage probable

Age du bronze : nouvelle activité pastorale avec espèces des sols dégradées (plantain, aulne vert) et ADN de moutons



Invasions barbares et/ou dégradation des sols : effondrement du pastoralisme

Intensification du pastoralisme

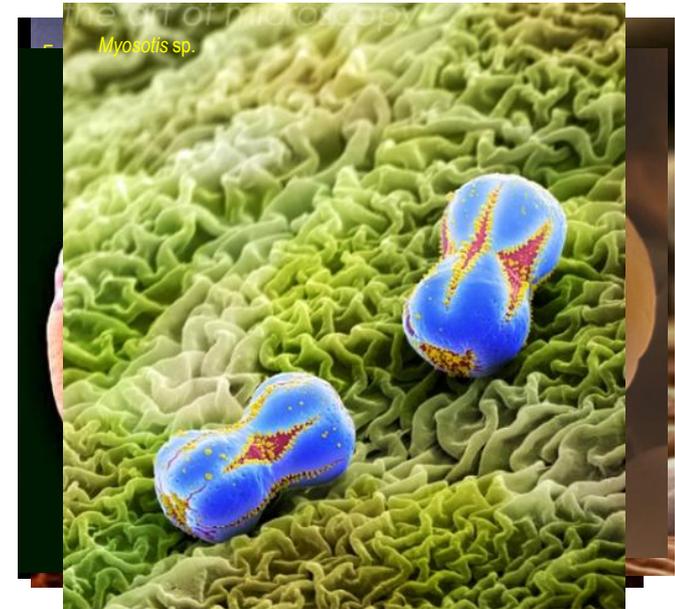
1200 après JC : transition de l'ovin vers le bovin, documentée par ailleurs

? Absence d'ADN ovin dans les sédiments récents alors que beaucoup pâturent autour du lac

Métabarcoding et utilisations commerciales

Que contient mon miel ?

- Traditionnellement, le pollen collecté par les abeilles est identifié par microscopie optique. Il faut des compétences et une expérience considérables, surtout pour certaines familles (*Campanulaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*) ayant peu de différence entre espèces ;
- Le Pays de Galles a été le premier à coder 98% de sa flore native (1143 espèces), idéal pour le métabarcodage. Le Canada a suivi ;
- Résultats de l'étude du pollen sur les abeilles : 92% de correspondance entre microscopie et métabarcodage pour les taxons avec abondance > 20%. (22 à 45% pour les espèces plus rares) ;



- Actuellement le métabarcodage ne permet pas de détecter toutes les espèces, ni une approche quantitative, mais cela suffit pour garantir la qualité des miels, à un coût et une vitesse incomparables.