

ADN « environnemental » : un saut méthodologique pour les inventaires de la biodiversité

Utilisée en France pour réaliser l'inventaire de la grenouille taureau dans le cadre d'un programme d'éradication de cette espèce envahissante, la méthode de l'ADNe a montré des résultats encourageants pour détecter l'espèce dans des sites où elle est présente à de faibles densités. Focus sur cette nouvelle méthode de détection à fort potentiel dans le domaine des inventaires de biodiversité et de la détection précoce des espèces envahissantes.



La connaissance précise de la biodiversité (telle que la diversité des espèces et leur répartition) est un pré-requis indispensable à la mise en place de toute opération de gestion des écosystèmes. Cette phase d'inventaire est d'autant plus importante lorsqu'il s'agit de la gestion d'espèces rares, menacées ou envahissantes. Cependant, les techniques d'inventaire actuelles permettent difficilement de détecter la présence de ces espèces rares ou discrètes, notamment en milieu aquatique. Il est possible de les identifier en collectant et analysant l'ADN contenu dans les « restes » (par exemple, des poils ou des débris végétaux) (Valentini *et al.*, 2009). L'utilisation des « restes » d'ADN dans les écosystèmes terrestres est permise par des conditions de conservation particulières : la composition de la flore et de la faune terrestres peut être reconstituée à partir de la composition en ADN d'échantillons collectés dans des carottes du pergélisol¹. De telles investigations ont montré que des fragments d'ADN de 100 bp² peuvent être conservés jusqu'à dix mille ans dans les régions tempérées, et jusqu'à cent mille ans à haute latitude. De l'ADN permettant d'identifier les organismes à été récolté dans des carottes de la calotte glaciaire datant de 450 000 à 800 000 ans (Willerslev *et al.*, 2007).

Il est aussi possible d'identifier une espèce animale à partir de l'ADN des cellules contenues dans ses fèces et urine, et même à partir de traces dans un support meuble (neige, vase). L'expansion actuelle de l'aire de répartition du loup en France et en Suisse a ainsi été démontrée par l'étude des fèces et poils récoltés sur le terrain.

L'ADN des organismes peut aussi se conserver sous une forme extracellulaire, appelée ADN « environnemental » (notée ADNe). Il s'agit de fragments plus ou moins grands de la molécule d'ADN présents dans l'eau et pouvant être stockés dans les sédiments marins et lacustres où ils représenteraient une concentration dix fois supérieure à celle de la biomasse vivante ! Un tel archivage représente un potentiel considérable de découverte de la biodiversité marine et lacustre.

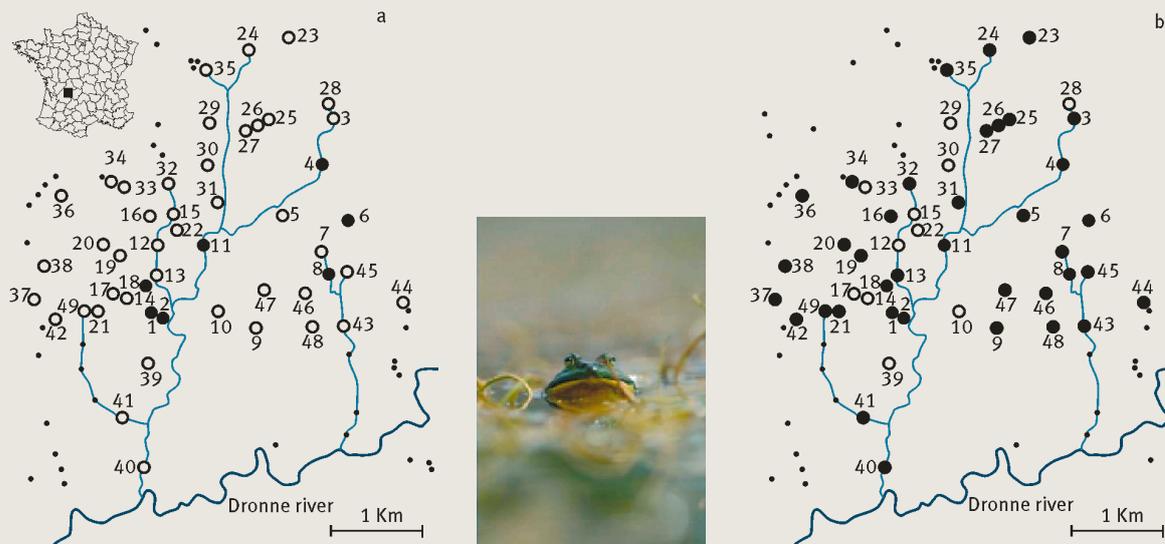
L'étude d'espèces aquatiques par la détection de leur ADN est réalisée depuis de nombreuses années pour des groupes comme les virus, les champignons, les bactéries et les protistes³. Ces travaux ont permis de constater que les espèces exotiques étaient centrées dans les ports maritimes et que les eaux de ballast constituaient la principale voie de propagation de ces apports. Les autres organismes aquatiques peuvent être présents sous forme d'œufs et leur détermination impossible sur des critères morphologiques, ce qui a incité le développement de méthodes basées sur leur identification génétique. Dans ce contexte, la détection

1. Sol (ou roche) qui se maintient à une température égale ou inférieure à 0 °C pendant au moins deux ans.

2. La longueur des molécules d'ADN ou d'ARN est comptée en paires de bases. Cette unité est notée bp (en anglais *base pairs*).

3. Les protistes forment un groupe extrêmement disparate qui rassemble les êtres vivants constitués d'une seule cellule (unicellulaires, par opposition aux plantes, champignons et animaux pluricellulaires) à noyau distinct (eucaryotes, par opposition aux bactéries ou procaryotes, dont la cellule ne possède pas de noyau).

❶ Comparaison de la détection de la présence de la grenouille taureau dans des sites aquatiques de Dordogne avec une méthode d'inventaire classique (a) et avec la méthode d'inventaire par ADNe (b).



Sur les 49 sites étudiés (symbolisés par des cercles), la grenouille taureau a été détectée sur 7 plans d'eau avec une méthode d'inventaire classique (écoutes nocturnes et prospections diurnes, cercles en noir sur la figure a) et sur 38 plans d'eau avec une méthode d'inventaire basée sur l'ADNe (cercles en noir sur la figure b). Photo Frank Taboury.

basée sur l'ADNe va se généraliser maintenant à toutes les espèces aquatiques.

La première utilisation de l'ADNe pour la détection d'une espèce aquatique de vertébrés a été réalisée en France en 2007. Elle concernait la grenouille taureau, *Lithobates catesbeianus*, introduite dans le Sud-Ouest de la France en 1968. Une campagne intensive d'inventaires (écoutes nocturnes des chants, pêches de têtards, recherche à vue de pontes), réalisée de 2003 à 2006, a permis de dresser la carte de répartition de cette espèce sur une surface de 35 500 Km². La grenouille taureau a été détectée dans 123 des 2 505 sites aquatiques prospectées, principalement en Gironde et en Dordogne. Cette connaissance des sites colonisés a permis de tester la technique de l'ADNe. Des prélèvements d'eau (3 échantillons de 15 ml) ont été réalisés dans trois plans d'eau sans grenouille taureau, dans trois plans d'eau où la grenouille taureau a été détectée sans preuve de reproduction (= abondance faible), et dans trois plans d'eau où l'espèce se reproduit et est donc abondante (présence de têtards). Les résultats corroborent les observations de terrain : l'espèce n'est jamais détectée sur les sites non colonisés, alors qu'elle est détectée dans les plans d'eau connus pour être colonisés (tableau ❶). Suite à la détection par inventaire classique de la grenouille taureau en Dordogne, le parc naturel du Périgord-Limousin a entrepris l'application d'un plan de lutte sur cette espèce envahissante. Basé sur des connaissances acquises en Gironde, ce plan comprend des campagnes de tir des adultes et juvéniles, de captures de têtards et de ramassage de ponte sur une cinquantaine de sites aquatiques.

À l'issue de deux années d'actions, des campagnes d'inventaire classique et de prélèvement d'eau pour des analyses d'ADNe ont été menées conjointement. Sur les quarante-neuf sites étudiés, la grenouille taureau a été détectée dans sept plans d'eau avec la méthode d'inventaire classique, et dans trente-huit plans d'eau avec une méthode d'inventaire

basée sur l'ADNe (figure ❶). Les tests au laboratoire confirment la parfaite sélectivité spécifique de la méthode et les expériences réalisées sur la persistance des fragments d'ADN utilisés pour l'identification de la grenouille taureau dans l'eau en milieu naturel montrent une durée de persistance relativement courte (inférieure à 1 mois, Dejean *et al.*, 2011). Cette méthode va être également utilisée au cours du programme de lutte contre la grenouille taureau dans le département du Loir-et-Cher pour valider le succès de l'éradication sur les sites traités.

Une étude récente utilise l'ADNe pour détecter la présence d'espèces envahissantes (Jerde *et al.*, 2011). Les carpes asiatiques *Hypophthalmichthys molitrix* et *H. nobilis* ont envahi une majeure partie du bassin du Mississippi où elles causent de nombreux dégâts (prédation, compétition, dérèglements trophiques, etc.) pour la biodiversité et divers services écosystémiques. Elles menacent maintenant les Grands Lacs Laurentiens du fait de la connexion entre le bassin du Mississippi et le bassin des Grands Lacs et de la Saint-Laurence, via des canaux d'origine anthropique autour et dans la ville de Chicago. Les chercheurs ont collecté un millier d'échantillons d'eau dans des sites colonisés à des degrés divers par les carpes, dans des sites où les carpes n'ont jamais été détectées et dans des sites en aval d'ouvrages empêchant leur colonisation (barrages électriques). Cette étude montre l'efficacité de la méthode et permet une analyse comparative intéressante des coûts de la méthode standard et ADNe

❶ SPYGEN

Issue du Laboratoire d'écologie alpine, la société SPYGEN est une start-up spécialisée dans l'utilisation de l'ADN pour l'étude de la diversité biologique (espèces animales, végétales, micro-organismes), dans l'environnement (à partir d'échantillons d'eau ou de sol) ou dans des substrats complexes (fèces, etc.).

Contact : contact@spygen.fr et informations : www.spygen.fr

► (calculés en jours-homme de pêche électrique et jour-homme de collecte d'eau et d'analyse au laboratoire). La détection décroît pour les deux méthodes quand on s'approche du front de colonisation (baisse d'abondance), mais la méthode ADN_e y présente un meilleur taux de détection. Une carpe a ainsi été capturée dans un site après 93 jours-hommes de pêche électrique, un effort de pêche inhabituel, motivé par un résultat positif obtenu par la méthode d'ADN_e (voir l'encadré 1 pour des propositions de coûts d'études).

De nombreux développements techniques autour de cette méthode restent encore à réaliser. Les aspects particulièrement travaillés au sein de notre laboratoire sont les outils bioinformatiques permettant d'identifier les meilleurs marqueurs génétiques pour les espèces étudiées, le contrôle qualité de l'échantillonnage (contamination, faux positifs et négatifs), les stratégies d'échantillonnage dans des milieux aquatiques très variés (plan d'eau, ruisseaux, grands fleuves) en relation avec l'amélioration des connaissances sur la persistance de l'ADN_e dans le milieu aquatique

(England *et al.*, 2005). Des expériences sont actuellement réalisées sur ce thème. Un poisson, placé dans une mare (4,40 x 2,80 x 0,60 m) pendant 24 heures, est détecté grâce à son ADN pendant près d'un mois après qu'il a été retiré du milieu. D'autres expériences sont réalisées en cours d'eau pour estimer la distance de détection d'un individu vers l'aval en fonction du débit du cours d'eau. Plusieurs de ces expériences sont conduites en collaboration avec l'Office national de l'eau des milieux aquatiques (Onema) afin de permettre l'usage de cette méthode pour l'inventaire de la faune piscicole, en particulier dans des milieux où les méthodes d'inventaire classique sont inefficaces ou présentent des impacts importants sur l'écosystème.

La méthode ADN_e est donc particulièrement sensible. Elle permet de détecter une espèce à très faible densité. Son potentiel dans le domaine des inventaires de biodiversité et de la détection précoce des espèces envahissantes devrait être rapidement démontré dans les études où elle est actuellement utilisée (mammifères aquatiques, écrevisse à pattes blanches, grenouille taureau, salmonidés, etc.). ■

1 Détection de la grenouille taureau par la technique de l'ADN_e (adapté de Ficetola *et al.*, 2008).

Sites	Abondance dans les sites *	Nombre d'échantillons d'eau positif **	Nombre de PCR *** positive au moins une fois
1	Faible	2/3	2/9
2	Faible	3/3	6/9
3	Faible	2/3	2/9
4	Forte	3/3	8/9
5	Forte	3/3	6/9
6	Forte	3/3	8/9
7	Absence	0/3	0/9
8	Absence	0/3	0/9
9	Absence	0/3	0/9

* Abondance de la grenouille taureau estimée par comptage des pontes, pêche des têtards et points d'écoute des chants des mâles.

** Nombre d'échantillons de 15 ml d'eau prélevé par plan d'eau (sur un total de 3) pour lequel la PCR a été positive à la présence de la grenouille taureau.

*** PCR = Réaction en chaîne par polymérase. Trois PCR ont été réalisées par échantillons (soit 9 PCR par plan d'eau).

Les auteurs

Claude MIAUD

Université de Savoie, UMR CNRS 5553 LECA, 73376 Le Bourget du Lac
✉ claudio.miaud@univ-savoie.fr

Pierre TABERLET

Université Joseph Fourier Grenoble 1, UMR CNRS 5553 LECA, 38041 Grenoble
✉ pierre.taberlet@ujf-grenoble.fr

Tony DEJEAN

Spygen, Savoie Technolac BP 274, 73375 Le Bourget du Lac Cedex
✉ tony.dejean@spygen.fr

Travaux réalisés en collaboration avec :

Éric COISSAC

Université Joseph Fourier Grenoble 1, UMR CNRS 5553 LECA, 38041 Grenoble
✉ eric.coissac@ujf-grenoble.fr

Christian MIQUEL

Université Joseph Fourier Grenoble 1, UMR CNRS 5553 LECA, 38041 Grenoble
✉ christian.miquel@ujf-grenoble.fr

François POMPANON

Université J Fourier Grenoble 1, UMR CNRS 5553 LECA, 38041 Grenoble
✉ francois.pompanon@ujf-grenoble.fr

Alice VALENTINI

Spygen, Savoie Technolac BP 274, 73375 Le Bourget du Lac
✉ alice.valentini@SPYGEN.FR

QUELQUES RÉFÉRENCES CLÉS...

- DEJEAN, T., VALENTINI, A., DUPARC, A., PELLIER-CUIT, S., POMPANON, F., TABERLET, P., MIAUD C., 2011, Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems, *PLoS ONE* 6(8): e23398. doi:10.1371/journal.pone.0023398.
- ENGLAND, L.S., POLLOK J., VINCENT M., KREUTZWEISER, D., FICK, W., TREVORS, J.T., HOLMES, S.B., 2005, Persistence of extracellular baculoviral DNA in aquatic microcosms : extraction, purification, and amplification by the polymerase chain reaction (PCR), *Mol Cell Probes*, n° 19, p. 75-80.
- FICETOLA, G.F., MIAUD, C., POMPANON, F., TABERLET, P., 2008, Species detection using environmental DNA from water samples, *Biology Letters*, n° 4, p. 423-425.
- JERDE, C., MAHON, A., CHADDERTON, W., LODGE, D., 2011, Sight-unseen detection of rare aquatic species using environmental DNA, *Conservation Letters*, sous presse.
- VALENTINI, A., POMPANON, F., TABERLET, P., 2009, DNA barcoding for ecologists, *Trend in Ecology and Evolution*, n° 24, p. 110-117.
- WILLERSLEV, E. *et al.*, 2007, Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested Southern Greenland, *Science*, n° 317, p. 111-114.



L'étude de l'ADN environnemental : une technique prometteuse pour évaluer la distribution d'espèces dans des environnements où elles sont difficiles à recenser, notamment en milieu aquatique.