

L'ADN environnemental au service de la biodiversité : premier état des lieux

Compte rendu du séminaire organisé par l'Agence française pour la biodiversité, le 18 octobre 2017 à Paris.

L'essor des techniques d'ADN environnemental ouvre des perspectives inédites pour l'étude et le suivi de la biodiversité en milieu aquatique. Alors que les attentes et les interrogations se multiplient sur le sujet, l'Agence française pour la biodiversité (AFB) s'est appuyée sur les premières expériences de terrain menées en France pour proposer une journée d'information et clarifier le champ des possibles.

Identifier rapidement et à bas coût l'ensemble des espèces présentes dans un milieu donné, en recherchant leurs « traces » génétiques dans un simple échantillon prélevé *in situ* (eau, sédiments...): telle est la promesse de l'ADN environnemental (ADNe), dont les développements récents laissent entrevoir une véritable révolution pour l'étude du vivant. L'intérêt des gestionnaires pour ces techniques émergentes s'accompagne de nombreuses questions. À quelles données l'ADNe donne-t-il accès? Avec quelle fiabilité? Dans quelle mesure offre-t-il une alternative aux méthodes d'inventaire classiques? En réponse, l'AFB a proposé un premier état des lieux, sur la base des retours d'expériences déjà menées en France: le 18 octobre dernier à Paris, plus de 170 personnes (chercheurs, collectivités, bureaux d'études, gestionnaires d'espaces naturels, associations) étaient réunies pour une journée d'information et de débat avec les spécialistes français de l'ADNe et ses premiers utilisateurs.

Mentionné dès 1987 dans la littérature, l'ADNe ne se développe dans le champ de la biodiversité qu'au cours de la dernière décennie. Les progrès rapides de la bioinformatique et des



© Ptolémée pour AFB

méthodes de séquençage portent l'essor des techniques de metabarcoding, qui visent la détection et identification dans un échantillon de toutes les espèces d'un groupe taxonomique donné (par exemple, les poissons ou les diatomées) – par opposition au barcoding, ciblant une seule espèce. En ouverture de la journée, Pierre

Taberlet (CNRS) a rappelé les grandes étapes d'une analyse d'ADNe par metabarcoding (voir figure 1, page suivante). Confirmant la pertinence de cette approche pour l'étude de la biodiversité, son coût désormais abordable et son faible impact sur les milieux, l'intervention en soulignait aussi les limites actuelles et le risque d'erreurs d'interprétation induit

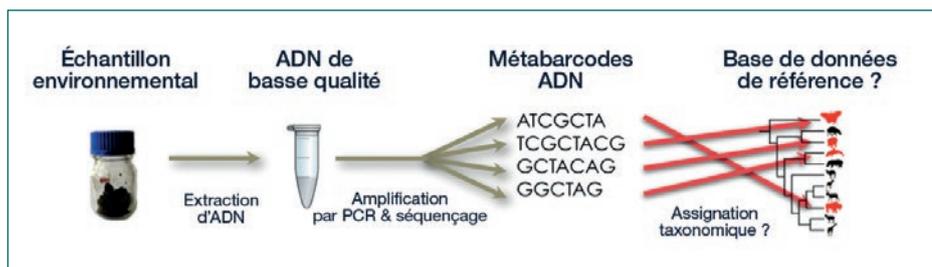


Figure 1. Principales étapes d'une analyse d'ADNe par metabarcoding.

par différents biais, de la conception du plan d'échantillonnage aux erreurs d'amplification et de séquençage de l'ADN. Les retours d'expériences présentés dans la suite ont illustré et précisé ces points de vigilance.

Les bivalves bons candidats, la loutre beaucoup moins

Les techniques d'ADNe peuvent s'appliquer *a priori* à tout groupe taxonomique. Les travaux présentés lors du séminaire témoignent de cette diversité : bivalves d'eau douce, mammifères aquatiques, poissons, écrevisses, amphibiens, invertébrés benthiques ou encore requins tropicaux ont fait l'objet d'études pilotes, avec des succès contrastés. Une première condition de réussite du metabarcoding est bien sûr de disposer de bases de références génétiques suffisamment robustes pour permettre l'assignation taxonomique des brins d'ADN issus des échantillons. C'est le cas des 39 espèces de bivalves d'eau douce présents en France, dont la base de références a pu être complétée à l'occasion d'une première expérience d'inventaire par metabarcoding, menée sur 12 cours d'eau en Métropole (V. Prié, Biotope). Le protocole mis en œuvre a offert des

résultats probants : en accord avec les connaissances issues des inventaires classiques pour les bivalves de grande taille, ils illustrent les avantages de l'ADNe pour la détection des espèces rares ou petites (< 1 mm), l'identification de ces dernières au microscope étant par ailleurs délicate. L'analyse de l'ADNe pourrait également s'avérer très fructueuse pour les requins. Une première approche (D. Mouillot, Univ. de Montpellier) a utilisé le metabarcoding sur 22 sites du littoral de Nouvelle-Calédonie : les résultats préliminaires suggèrent une diversité spécifique supérieure à ce qu'indiquaient les données d'observation issues de centaines de plongées.

Par contraste, d'autres groupes semblent laisser peu de traces génétiques dans leur milieu. C'est ce que souligne une autre étude pilote, ciblée quant à elle sur 12 espèces de mammifères semi-aquatiques (J. Steinmetz, ONCFS). Le protocole, testé sur des plans d'eau dont les populations sont connues par ailleurs, a livré des résultats assez cohérents pour les rongeurs, mais décevants pour les mammifères carnivores. La loutre d'Europe par exemple, dont la présence était avérée localement, n'a pu être détectée par metabarcoding, malgré plusieurs modifications du plan d'échantillonnage.

Bruno Barbey, Fédération des associations agréées pour la pêche et la protection du milieu aquatique (FDAAPPMA) de l'Indre

L'ADNe est un sujet que nous suivons depuis quelques années avec beaucoup d'intérêt. Les progrès sont rapides, comme l'ont montré les travaux présentés au cours de cette journée. À court terme, certaines applications pourraient être mises au service de nos actions pour la connaissance des milieux, comme l'analyse de régime alimentaire ou la détection ciblée d'espèces rares. Nous pourrions par exemple mobiliser l'ADNe pour rechercher localement la lotte de rivière, que nous n'avons plus vue depuis 10 ans, ou localiser des micro-populations d'écrevisses à pattes blanches sur des tronçons de ruisseaux. Mais pour se lancer concrètement, un petit guide méthodologique serait le bienvenu, ne serait-ce que pour savoir vers qui se tourner et comment bâtir une étude !

Détectabilité de l'ADNe et lien avec l'abondance

Les quantités d'ADN relâchées dans l'environnement diffèrent d'une espèce à l'autre, d'un groupe à l'autre. Certains mécanismes biologiques facilitent *a priori* l'émission de matériel génétique : respiration branchiale, filtration de l'eau (mollusques), mue (crustacés)... La concentration des molécules peut varier dans l'espace, en lien avec les habitats fréquentés (surtout en eau stagnante), et aussi dans le temps : les périodes de reproduction constituent par exemple des pics de présence de l'ADN dans l'eau. Ces éléments, qui conditionnent la détectabilité d'une espèce par metabarcoding, doivent être considérés pour toute approche *in situ*, de la stratégie d'échantillonnage à l'interprétation des résultats. Quant à la question du lien entre le nombre de lectures d'une séquence ADN par un séquenceur (les « reads » dans le jargon) et l'abondance d'une espèce dans le milieu, attente récurrente en matière d'ADNe, elle reste un sujet de recherche. Un état des lieux sur les amphibiens (C. Miaud, EPHE) a notamment exposé des résultats récents, mesurant en aquarium ou en bassin des corrélations entre nombre d'individus et concentration en ADNe : l'établissement de relations statistiques et des facteurs d'incertitudes associés n'apparaît possible, à terme, que dans certaines conditions.

En comparaison, le lien ADNe-biomasse est plus robuste dans le cas des matrices comme le biote (broyat d'invertébrés) ou les fèces, où l'ADN est essentiellement contenu dans les organismes. Une étude consacrée au régime alimentaire de l'apron du Rhône (V. Dubut, IMBE) a par exemple posé les bases d'une approche quantitative en metabarcoding alimentaire : l'analyse des fèces par ADNe a donné des résultats cohérents avec les analyses au microscope de contenus stomacaux.

Une indication solide en « présence-absence »

Pour l'heure, le metabarcoding apparaît surtout opérationnel pour une utilisation en « présence-absence ». L'amélioration des bases de références et du traitement bioinformatique contribue à limiter les faux

Aline Cattan, Agence de l'eau Seine Normandie

Les différentes présentations du séminaire, à la fois précises et pédagogiques, ont permis de mieux cerner ce qu'il sera possible de faire avec l'ADNe. Pour la surveillance, les interventions semblent révéler des techniques effectives à court ou moyen terme par exemple pour les diatomées. La baisse des coûts du metabarcoding est bien sûr un argument fort, même si nous avons encore peu d'éléments concrets sur ce point. Pour le reste, les questions inhérentes à la bioindication sont inchangées : l'échantillonnage, le choix des stations, le couplage avec l'expertise... Mes attentes portent davantage sur des utilisations opérationnelles de l'ADNe hors de l'évaluation DCE : plutôt liées au diagnostic, au suivi en restauration ou bien sûr aux effets du changement climatique. Les techniques génétiques pourraient être intégrées davantage dans nos réflexions collectives sur ces sujets.

positifs, ou détection d'une espèce en réalité absente. Le risque de faux négatifs (non-détection d'une espèce pourtant présente) peut être réduit par l'ajustement des protocoles expérimentaux (volumes prélevés, nombre de réplicas, choix des amorces). Ces évolutions font aujourd'hui de l'ADNe un outil crédible pour la détection d'espèces cibles ou les inventaires faunistiques. Une étude centrée sur l'écrevisse de Louisiane, invasive en France, a par exemple comparé

Luc Barbe, Dreal Occitanie

En matière d'ADNe, les choses évoluent très rapidement. Si le rythme se maintient, le metabarcoding est appelé à modifier en profondeur les stratégies de surveillance. Ce sera probablement pour l'après-2027 : entre-temps il faudra stabiliser les techniques, compléter les banques de référence, réduire les incertitudes, puis normaliser des méthodes et les introduire dans la réglementation. Une telle évolution est à encourager, car elle pourrait rendre la bioindication plus fiable et moins coûteuse, au moins pour certains compartiments comme les diatomées. Il faudra cependant éviter, à mon sens, le piège de la génétique « hors-sol » : la montée en puissance de l'ADNe ne doit pas se faire au détriment de l'expertise taxonomique classique, mais au contraire l'accompagner et contribuer à sa pérennisation.

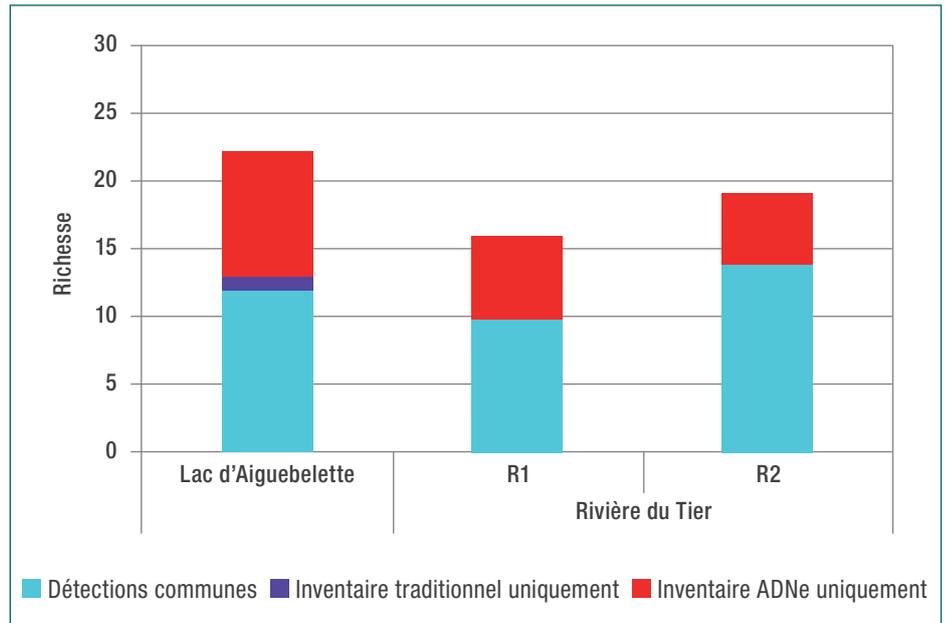


Figure 2. Comparaison des détections par ADNe et des résultats simultanés de pêches électriques sur la rivière du Tier ou d'échantillonnage au filet dans le lac d'Aiguebelette (Source : R. Civade, Irstea).

les résultats d'une recherche par barcoding dans un réseau de mares des marais de Brière, avec les captures effectuées en parallèle par un protocole de piégeage par nasses. Le bilan met en évidence une complémentarité intéressante entre les deux approches : l'ADNe offre une efficacité de détection supérieure tandis que les nasses donnent une estimation fiable de l'abondance pour les mares déjà bien colonisées.

Plus largement, l'ADNe apparaît bien adapté au suivi des invasions biologiques, combinant capacité de détection précoce, large couverture spatio-temporelle et coût compétitif. Il pourrait notamment être déployé en mer, en réponse aux exigences de la directive cadre stratégie pour le milieu marin, dont l'un des descripteurs porte sur les espèces non indigènes. Plusieurs exemples

d'applications récentes ont été présentés à l'appui de cette idée (F. Viard, CNRS) : ainsi au Canada, une étude pilote menée sur 124 espèces exotiques cibles dans les eaux littorales (crustacés, mollusques et ascidies) a permis de détecter par metabarcoding 24 d'entre elles, dont 11 non repérées jusqu'alors.

Une alternative aux pêches électriques... pour certaines données

Autre perspective prometteuse pour la gestion, l'utilisation de l'ADNe pour les inventaires piscicoles a fait l'objet de plusieurs études récentes. L'une d'elles (R. Civade, Irstea) a comparé la représentativité d'un protocole de metabarcoding avec des échantillonnages simultanés ou passés, par pêche électrique ou au filet, sur cinq stations de la rivière du Tier ainsi que dans le lac d'Aiguebelette situé en amont. En présence-absence, cette approche a confirmé une efficacité de détection nettement supérieure aux inventaires classiques menés en parallèle : un quart à un tiers des espèces étaient révélées uniquement par leur ADN (voir figure 2). Des éléments précis ont également été apportés sur la distance de détection de l'ADNe en rivière, à travers le cas du corégone : purement lacustre, celui-ci est encore détecté à 1,7 km de l'exutoire, mais ne l'est plus à 3,6 km. L'étude conclut que le metabarcoding permet d'approcher

la richesse spécifique totale, et de décrire correctement l'organisation spatiale des communautés piscicoles... le tout avec un effort de terrain limité, et un impact nul sur le milieu.

Ces éléments en font un outil particulièrement indiqué en grandes rivières, où la pêche électrique est moins opérante. Dans le Rhône français, des prélèvements ont ainsi été réalisés en 2016 sur 97 stations réparties du lac Léman à l'embouchure, et analysés par metabarcoding (M. Rocle, CNR ; D. Pont SPYG EN/VigiLIFE). Les résultats ont été discutés à la lueur d'une décennie de suivis par pêche électrique (EDF ou AFB) : d'une station à l'autre le nombre d'espèces détectées par la méthode ADNe est toujours proche de la richesse totale connue ; elle est toujours supérieure à la richesse moyenne obtenue pour une seule année. Les échantillonnages traditionnels restent cependant incontournables pour accéder aux données biométriques et estimer l'abondance.

Diatomées, invertébrés : vers une bioindication sans microscope ?

Les dernières présentations de la journée étaient consacrées aux possibilités d'utilisation de l'ADNe dans les outils de bioindication, utilisés notamment en routine dans l'évaluation de l'état écologique prévu par la directive cadre sur l'eau.

À court et moyen terme, les perspectives concernent surtout les compartiments biologiques pour lesquels l'analyse de l'ADNe pourrait se substituer à l'identification au microscope (longue et fastidieuse), sans modification des protocoles d'échantillonnage terrain. C'est le cas de l'indice basé sur les diatomées, groupe d'algues microscopiques rassemblant des milliers d'espèces : une étude soutenue par l'AFB, en parallèle des campagnes d'évaluation, compare les valeurs de l'indice obtenu par une analyse ADNe des échantillons, avec celles obtenues par la méthode classique. Un premier bilan (A. Bouchez, INRA) confirme la viabilité du concept, dans un contexte de raréfaction de l'expertise

taxinomique. Deux obstacles restent à lever : l'incomplétude de la base de références, ainsi que les forts écarts de biovolumes entre espèces de diatomées (d'un facteur 1 à 30) qui biaisent la description des communautés par metabarcoding. De même, pour la bioindication basée sur les invertébrés benthiques, l'ADNe permettrait de s'affranchir avantageusement des travaux de tri et d'identification des animaux. Une première démarche sur données réelles (Ph. Usseglio, CNRS) a permis de tester différentes options méthodologiques en ce sens : les résultats sont globalement encourageants, avec des voies d'amélioration à explorer sur d'autres jeux de données.

Plus largement, les perspectives d'utilisation de l'ADNe dans la surveillance réglementaire des masses d'eau font l'objet d'une coordination à l'échelle européenne, à travers le réseau d'expertise DNAqua-Net, qui rassemble scientifiques, porteurs d'enjeux et gestionnaires. Les travaux envisagent l'intégration de l'ADNe à certaines étapes des indicateurs existants (il s'agit alors de réaliser la même évaluation à un coût réduit), mais aussi, de manière plus prospective, l'opportunité de réécrire entièrement certains indicateurs à l'aune des nouvelles possibilités qu'ouvre l'ADNe.

Des applications aussi pour la biodiversité terrestre

Si les exemples présentés ci-dessus concernent les milieux aquatiques, la même révolution méthodologique opère également en milieu terrestre. Une des applications les plus fréquentes pour l'instant consiste à étudier les régimes alimentaires d'animaux à partir de fèces ou de contenus stomacaux. Une autre possibilité est l'analyse de la biodiversité des sols. Cette approche s'applique maintenant en routine pour les bactéries et les champignons. Plusieurs études ont également montré que le metabarcoding peut être utilisé à grande échelle pour détecter la méso- et la microfaune du sol (annélides, arthropodes, eucaryotes unicellulaires, etc.).

Technologie de rupture, l'ADNe est donc appelé à faire bouger les lignes dans les domaines de l'étude et du suivi de la biodiversité. Les contributions discutées au cours de cette journée d'échanges ont illustré la diversité de ses applications potentielles, pour la recherche mais aussi, déjà, pour la gestion et la protection du vivant. Elles ont précisé ses avantages et ses limites par rapport aux méthodes existantes : selon la question posée, l'ADNe pourra s'y substituer dans certains cas ; le plus souvent il offre une approche complémentaire. Les axes de progression restent nombreux, de la complétion des bases de références à l'exploration des relations ADNe-abondance, de l'amélioration des protocoles expérimentaux à l'émergence d'une expertise partagée pour l'interprétation des résultats.

En attendant, l'ADNe a d'ores et déjà toute sa place dans la « boîte à outils » de la préservation du vivant : la pêche aux traces génétiques est ouverte ! ■

Pour en savoir plus

Diaporamas du séminaire :
<http://www.onema.fr/seminaire-adn-environnemental-2017>

Organisation du séminaire

Nicolas Poulet et Frédérique Martini (AFB)
Agence Ptolémée

LES Rencontres

Directeur de publication : Christophe Aubeil
Coordination : Véronique Barre et Béatrice Gentil-Salasc
(direction de la recherche, de l'expertise et du développement des compétences)

Rédaction : Laurent Basilico, Nicolas Poulet

Maquette : Éclats Graphiques

Réalisation : www.kazoar.fr

Impression : Estimprim

Impression sur papier issu de forêts gérées durablement

AFB : 5 square Félix Nadar - 94300 Vincennes

Disponible sur :

<http://www.onema.fr/Les-rencontres-de-l-Onema>

ISBN web : 978-2-37785-033-4

ISBN print : 978-2-37785-034-1

