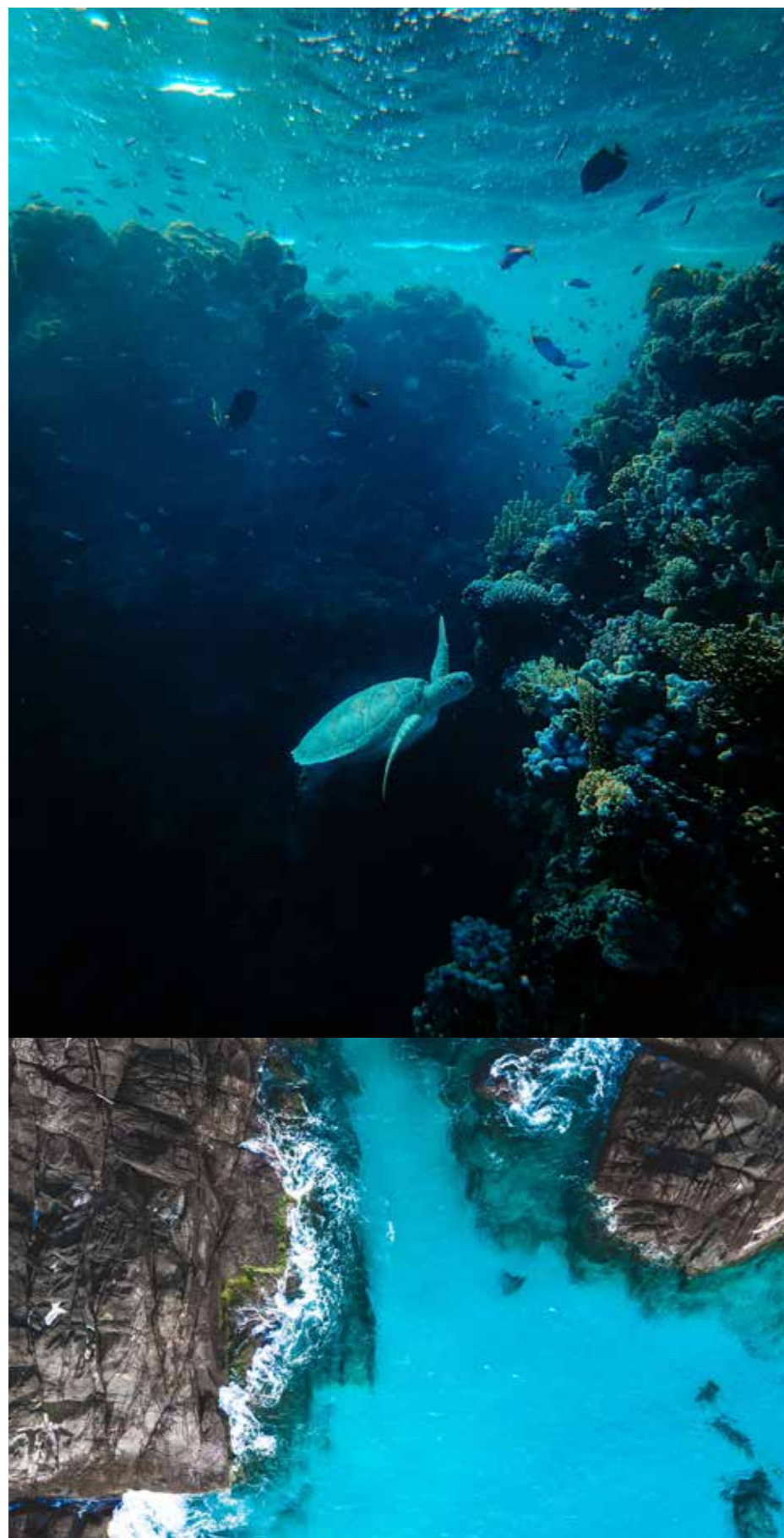


/Guide d'utilisation de l'ADNe en

milieu marin

Connaître, comprendre et utiliser
l'ADN environnemental pour préserver
la biodiversité marine



Auteur.e.s : Carolane Giraud (SPYGEN), Pierre Boissery (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse), Alicia Dalongeville (SPYGEN), Tony Dejean (SPYGEN), Julie Deter (Andromède Océanologie), Aurélie Lacoeuilhe (PatriNat), David Mouillot (Université de Montpellier)

Date de parution : 09 septembre 2024

Comment citer ce document : Giraud Carolane, Boissery Pierre, Dalongeville Alicia, Dejean Tony, Deter Julie, Lacoeuilhe Aurélie et Mouillot David. 2024. Guide d'utilisation de l'ADN environnemental en milieu marin. Connaître, comprendre et utiliser l'ADNe pour préserver la biodiversité marine. 88p.

Direction artistique : Here we com

Nous remercions les relecteurs et relectrices de ce guide : Andromède Océanologie : Gwenaëlle Delaruelle, Florian Holon ; SPYGEN : Coline Gaboriaud, Alice Valentini ; Vigilife : Benjamin Allegrini, Albane Loiseau, Baptiste Mulet, Franck Pressiat.

Nous remercions également les experts et expertes ayant accepté d'intervenir dans ce guide : Aurélien Besnard, Roberto Danovaro, Madeleine Cancemi, Cinzia Corinaldesi, Nadia Faure, Yvan Griboval, Anaïs Gudefin, Florian Holon, Jean-Baptiste Juhel, Letizia Lamperti, Gilles Lecaillon, Greg Lecoeur, Stéphanie Manel, Stefano Varrella.

Enfin, nous remercions l'ensemble des personnes ayant participé à l'élaboration de ce guide tant pour son contenu que pour ses illustrations : Laurent Ballesta, Arnaud Collin, Tangi Corveler, Régis Hocdé, Greg Lecoeur, Laure Velez.

Ce guide, proposé par l'alliance internationale Vigilife, est l'un des livrables du projet eREF, financé par l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse et porté par l'Université de Montpellier en partenariat avec les entreprises Andromède Océanologie et SPYGEN.



www.vigilife.org



Notre mission

Mettre l'innovation au service de la connaissance et de la protection du vivant

Nos valeurs

Innovation, exigence, partage, engagement

Nos objectifs

Fédérer

Réunir des partenaires publics et privés engagés, afin de multiplier les sites d'observation et de permettre une large utilisation des données collectées.

Évaluer

Inventorier la biodiversité grâce à des méthodes ADNe standardisées et suivre ses changements sur le plus grand nombre d'écosystèmes à travers le monde.

Veiller

Prévenir le déclin des espèces les plus menacées de notre planète, et améliorer la détection précoce et le suivi des espèces exotiques envahissantes et des pathogènes, notamment au niveau des principales voies d'introduction.

Comprendre

Analyser et modéliser les données recueillies à l'échelle mondiale afin d'améliorer les connaissances sur la biodiversité et de mieux anticiper l'impact des changements globaux sur l'ensemble du vivant.

Innover

Poursuivre en permanence les travaux de recherche et développement afin de proposer des technologies toujours plus performantes, respectueuses de l'environnement et accessibles au plus grand nombre.

Orienter

Offrir à tous les décideurs des informations fiables et mises à jour, grâce à des indicateurs synthétiques et validés scientifiquement, afin de guider la mise en place d'actions de conservation, de restauration, ou de changement de pratiques.

Former

Décentraliser les moyens d'expertise ADNe, grâce à du transfert de compétences et de technologies, afin que chaque partenaire puisse traiter ses échantillons sur son territoire et que chaque pays reste souverain sur l'utilisation de ses ressources génétiques.

Sensibiliser

Accompagner les acteurs publics et privés pour une meilleure prise en compte de la biodiversité dans leurs activités et informer le grand public sur son importance et sa fragilité.

Valoriser

Mettre en valeur les bonnes pratiques et les actions inspirantes permettant de préserver le vivant, notamment celles menées par les populations autochtones.

Pérenniser

Doter Vigilife de moyens financiers pérennes lui permettant de poursuivre sa mission sur le long terme, grâce notamment à l'engagement du monde économique dans son fonctionnement.

Membres partenaires



Membres fondateurs



eREF: État de référence de la biodiversité en Vertébrés dans les masses d'eaux côtières méditerranéennes à partir de l'ADN environnemental

Qui ? L'Université de Montpellier en partenariat avec les entreprises Andromède Océanologie et SPYGEN et avec le soutien financier de l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse.

Quand ? avril 2020 à décembre 2023.

Où ? 204 échantillons prélevés sur des sites anthropisés, des aires marines protégées et des zones mésophotiques (50 à 100 m de profondeur) en mer Méditerranée.

Comment ? Par optimisation des méthodes d'analyse de l'ADNe (volumes d'eau filtrés, périodes et méthodes d'échantillonnage, profondeur de prélèvement, implémentation des bases de références génétiques, etc.).

Quoi ? Recenser la diversité des vertébrés en mer Méditerranée au cours du confinement strict du printemps 2020.

Ce contexte exceptionnel de très faibles perturbations a permis de ré-échantillonner des sites préalablement visités en 2018 ou 2019. A partir des données récoltées, 14 indicateurs ont été calculés afin d'évaluer l'état des eaux côtières en matière de biodiversité de poissons. Les résultats ont montré que les espèces se sont rapprochées du littoral et/ou sont remontées des profondeurs au cours du confinement ; puis, que cette tendance a rapidement disparu après la levée des restrictions sanitaires.



Pour en savoir plus : Deter et al. 2023. 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.
https://medtrix.fr/wp-content/uploads/2023/04/eREF-rapport2023_VF.pdf



GUIDE D'UTILISATION DE L'ADNe EN MILIEU MARIN

Préface ⁰⁰

Les mers et océans ont beau couvrir la majorité de notre planète en surface (70 %) et en volume de l'espace habitable (98 %), ils n'en restent pas moins une grande étendue opaque en termes d'appréhension visuelle et de connaissances. Ce mélange d'immensité et d'inconnu est à l'origine de bien des histoires et légendes mais aussi une invitation aux expéditions et découvertes captivantes. Malgré les contraintes (luminosité, pression), la vie s'y épanouit de manière surprenante... pourtant, nous commençons seulement à en effleurer sa diversité et sa compréhension.

Aujourd'hui, alors que les activités humaines et leurs conséquences n'ont jamais autant menacé la biodiversité marine, il devient impératif d'utiliser toutes les ressources à notre disposition pour comprendre, préserver et restaurer les écosystèmes marins. Quoi de mieux que d'utiliser la molécule de base du vivant pour étudier la biodiversité ? Chaque nouvelle technologie apporte son lot de promesses et l'ADN environnemental (ADNe) émerge comme une avancée révolutionnaire révélant le monde sous-marin sous une nouvelle lumière. Pour autant, le but n'est pas de remplacer les méthodes traditionnelles (caméras, acoustique, etc.) mais bien de les compléter, d'apporter d'autres réponses pour se poser de nouvelles questions.

Face au double impératif de lutte contre le changement climatique et l'insécurité alimentaire, le vaste océan apparaît comme un acteur central et pourtant méconnu. Dans ce contexte, les attentes envers l'ADNe, outil qui apparaît encore mystérieux voire suspicieux pour certains, sont encore plus fortes. Mais que peut-on réellement détecter avec l'ADNe ? Quelles sont ses limites ? Comment ça marche ? De quels matériels a-t-on besoin ? Autant de questions auxquelles ce guide souhaite apporter des réponses claires et documentées.

Ce guide d'utilisation de l'ADN environnemental en milieu marin se veut être une ressource accessible et opérationnelle pour tous celles et ceux qui aspirent à mieux connaître, surveiller, comprendre, restaurer et protéger nos mers et océans. Il offre une vue d'ensemble illustrée et documentée de cette technologie innovante, de son fonctionnement, et de ses applications pratiques. Grâce à cet outil, les chercheurs, les étudiants, les gestionnaires de la nature, les décideurs politiques et même les citoyens peuvent désormais explorer les mystères de l'océan avec une précision inégalée.

Né d'une collaboration entre entreprises, établissements publics et organismes de recherche académique, ce guide est aussi le reflet de la responsabilité partagée que nous avons envers notre environnement marin et de la nécessaire coopération à mettre en place entre tous les acteurs. En partageant nos connaissances et nos expertises, nous souhaitons œuvrer pour que la biodiversité marine continue d'inspirer et d'émerveiller les générations futures.

Ni l'un ni l'autre sommes des biologistes moléculaires, mais nous avons vu dans l'ADNe une autre façon de répondre à nos questions. Alors, pourquoi pas vous ?

Julie Deter, maîtresse de conférences associée à l'Université de Montpellier, UMR MARBEC et cheffe de projets R&D à Andromède Océanologie
David Mouillot, professeur à l'Université de Montpellier, UMR MARBEC

L'ADNe émerge comme une avancée révolutionnaire révélant le monde sous-marin sous une nouvelle lumière.

Sommaire

2024

vigilife

CHAPITRE 9 – Mieux connaître pour mieux protéger 72

CHAPITRE 8 : Limites et avantages de l'ADNe 68
 Limites 68
 Avantages 69

PARTIE 4
 Agir dans les territoires P.66

CHAPITRE 7 : Quelques exemples d'applications et d'interprétations 58

CHAPITRE 6 : Le cycle de la donnée ADNe 52
 Définitions 52
 Type de données issues d'ADNe 53
 Conserver, diffuser et utiliser les données 55

PARTIE 3
 Diffuser et interpréter les données obtenues... P.50

CHAPITRE 5 : Analyses laboratoire et bioinformatique 40
 Extraction de l'ADNe 42
 Détection d'une espèce cible par approche spécifique... 43
 Approche multispécifique ou metabarcoding de l'ADNe... 47

Préface 5
 Résumé 8
 Introduction 13

PARTIE 1
 Comprendre l'ADNe P.14

CHAPITRE 1 : Contexte général 16
 Historique des méthodes de recensement de la biodiversité marine 16
 L'ADNe : Émergence, définition et applications 19

CHAPITRE 2 : Ecologie et détectabilité de l'ADNe 22
 Ecologie de l'ADNe : composition, origine, transport et dégradation 22
 Des méthodes standardisées optimisées pour la détection d'ADNe rare 24

PARTIE 2
 Acquérir des données issues de l'ADNe .. P.26

CHAPITRE 3 : Concevoir un projet .. 28
 Définir l'objectif de l'étude 28
 Identifier les acteurs à mobiliser 29
 Anticiper les ressources financières et les délais à allouer 30
 Elaborer une stratégie d'échantillonnage 30

CHAPITRE 4 : Réaliser un échantillonnage 36
 Matériel préconisé 37
 Protocoles recommandés 38
 Conservation des échantillons et données à récolter 39

Conclusions & perspectives P.82

Conclusions 82
 Perspectives 83
 Glossaire 86
 Bibliographie 87

Résumé ⁰⁰

Comprendre l'ADNe

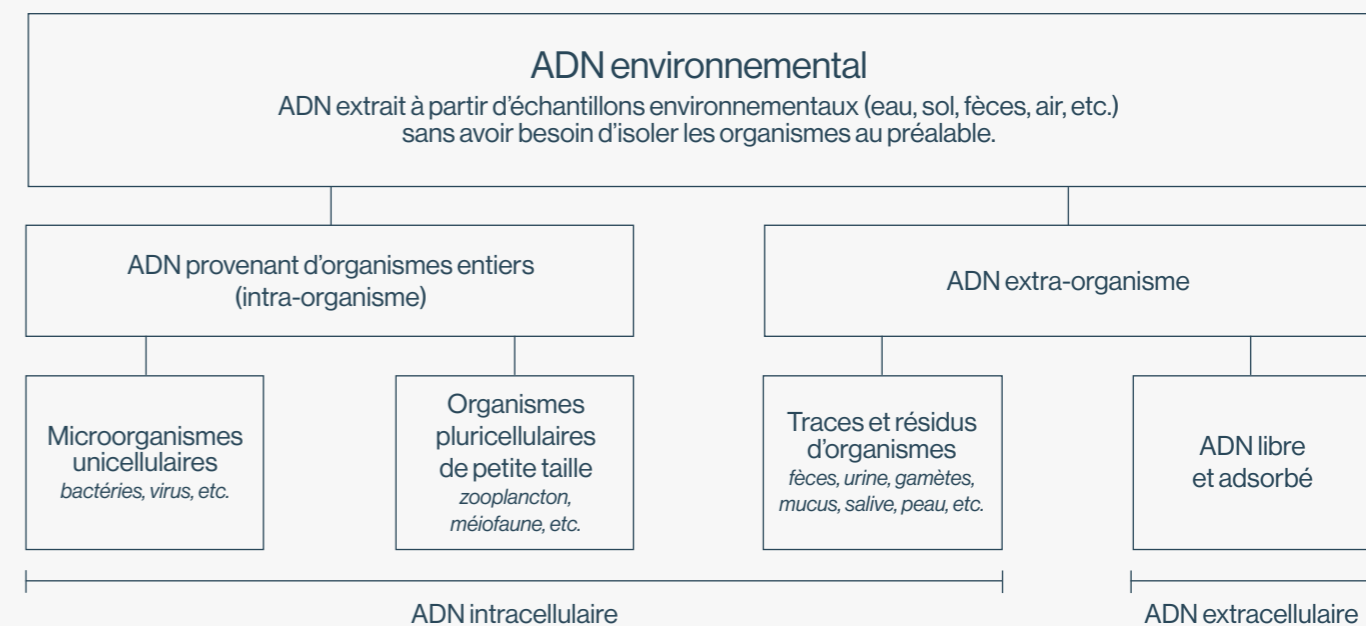
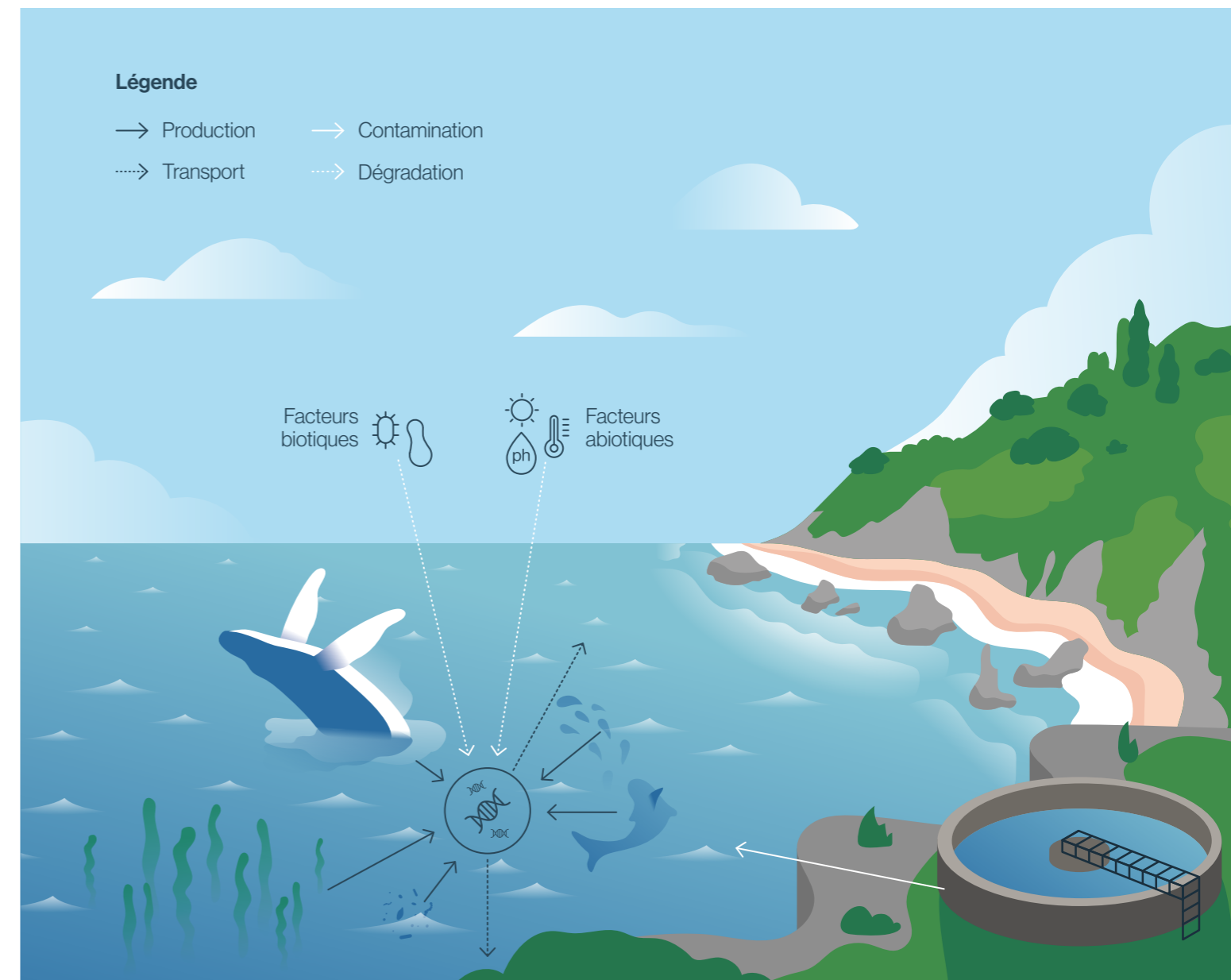
Contexte général

L'ADN environnemental, ou ADNe, est défini comme l'ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux sans nécessiter d'isoler, au préalable, les organismes ciblés^a. Ainsi, grâce à l'analyse de l'ADNe, les espèces présentes dans un milieu donné peuvent être détectées par prélèvement et identification des traces d'ADN qu'elles laissent dans leur environnement. Depuis 2008, cette méthode novatrice a démontré son efficacité dans le domaine de la biologie de la conservation, notamment pour la réalisation d'inventaires et de suivis de la biodiversité^b. En permettant, entre autres, l'étude de l'ensemble des règnes du vivant et la détection d'espèces clés (protégées, menacées, exotiques envahissantes, etc.), cryptiques ou invisibles à l'œil nu, elle s'intègre comme un outil complémentaire aux autres méthodes de recensement de la biodiversité marine (captures, recensements visuels, hydroacoustique).

Depuis 2008, cette méthode novatrice a démontré son efficacité pour la réalisation d'inventaires et de suivis de la biodiversité.

Écologie de l'ADNe

La distance de détection et la durée de persistance de l'ADNe sont influencées par son écologie, c'est-à-dire par la composition, l'origine, le transport et la dégradation des molécules d'ADN dans l'environnement^c. En milieu marin, l'ADNe tend à être dilué dans des volumes importants et est donc, généralement, présent en très faibles quantités dans la colonne d'eau. La détectabilité des espèces dépend de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu, de la préservation de cet ADN au cours du processus analytique et de l'absence de contamination des échantillons considérés. Ainsi, lorsque l'objectif de l'utilisateur est d'obtenir une liste d'espèces la plus exhaustive possible tout en limitant les risques de faux-négatifs et de faux-positifs, il est nécessaire de choisir des méthodes d'échantillonnage et d'analyse respectant les plus hauts niveaux de précaution possibles. Les méthodes déployées dans le cadre de Vigilife, et présentées pas à pas dans ce guide, ont été développées en ce sens.



RÉSUMÉ

Acquérir des données issues d'ADNe

Concevoir un projet

La conception d'un projet basé sur l'analyse de l'ADNe consiste à :

- Définir l'objectif de l'étude en identifiant les questions posées par l'utilisateur ainsi que les taxons et les zones géographiques ciblées.
- Identifier le commanditaire de l'étude, l'échantillonneur, le gestionnaire de données ainsi que les experts technologiques et écologiques.
- Anticiper les ressources financières et les délais à allouer en dialoguant avec les experts précédemment identifiés.
- Élaborer une stratégie d'échantillonnage optimale en choisissant une méthode adaptée aux objectifs identifiés ainsi que le nombre d'échantillons à prélever et leur répartition spatio-temporelle, tout en identifiant les réglementations en vigueur à respecter.

Réaliser un échantillonnage

La collecte d'échantillons en milieu aquatique consiste à prélever plusieurs litres d'eau. Il existe de nombreuses méthodes permettant de réaliser ce type de prélèvements mais toutes ne sont pas adaptées aux objectifs fixés par l'utilisateur. Dans le cadre de Vigilife, les échantillons sont prélevés en réplicas, en filtrant directement sur site plusieurs dizaines de litres d'eau à l'aide d'une pompe motorisée péristaltique munie d'une capsule de filtration renfermant une membrane d'une porosité égale à 0,2 µm. Une fois la filtration terminée, du tampon de conservation est versé dans la capsule de filtration afin de recouvrir le filtre et ainsi préserver l'ADNe retenu à sa surface.

Analyser au laboratoire

Comme pour l'échantillonnage, il existe diverses méthodes pouvant être déployées au laboratoire mais toutes ne sont pas optimisées pour la réalisation d'inventaires et de suivis de la biodiversité. Dans le cadre de Vigilife, les échantillons récoltés sont analysés dans un laboratoire respectant des niveaux de précaution stricts. L'ADN contenu dans les échantillons environnementaux est d'abord extrait puis, selon les besoins de l'utilisateur, analysé par approche spécifique ou multispécifique (aussi appelée metabarcoding de l'ADNe). L'approche spécifique consiste à révéler la présence d'une espèce d'intérêt par détection d'une séquence précise de son ADN. En effet, si cette séquence, aussi appelée marqueur génétique, est présente dans l'échantillon, elle peut être ciblée grâce à des amorces, consistant en de courtes séquences synthétiques d'ADN, puis amplifiée par polymérisation en chaîne (PCR) ou méthode dérivée (PCR quantitative ou digitale). Inversement, l'approche multispécifique permet l'identification simultanée et sans *a priori* de plusieurs espèces distinctes appartenant à un même groupe taxonomique ^d. Pour cela l'ADN extrait est d'abord amplifié par PCR en utilisant des amorces universelles. Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite séquencés et les résultats de séquençage sont analysés par méthodes bioinformatiques. Lors de cette dernière étape, les séquences détectées sont assignées taxonomiquement en les comparant à des bases de références génétiques.

© Greg Lecoeur, WE ARE MEDITERRANEE



RÉSUMÉ

Diffuser et interpréter les données

Cycle de la donnée

Les différentes étapes d'échantillonnage et d'analyse de l'ADNe impliquent qu'il existe différents types de données issues d'ADNe. Elles englobent les données physiques (échantillons prélevés et extraits ADN) et les données numériques (données brutes issues du séquençage, données interprétées et données validées). Plusieurs informations sont susceptibles d'être rattachées à l'ensemble de ces données. Ce guide propose des pistes de réflexion quant aux informations à collecter et aiguille l'utilisateur pour définir la propriété des données ainsi que pour anticiper leur lieux et temps de stockage. Les différentes plateformes de mise à disposition des données en France et à l'international sont également présentées.

Applications et interprétations

Des témoignages d'experts montrent comment l'interprétation des données issues de l'analyse de l'ADNe peut conduire au développement d'indicateurs, à l'étude des communautés marines benthiques, à la détection d'espèces rares ainsi qu'à l'évaluation de la biodiversité d'environnements portuaires ou tropicaux.

Agir dans les territoires

Mieux connaître pour mieux protéger

Comme toutes les méthodes de recensement de la biodiversité, les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe sont confrontées à un certain nombre de limites. Cependant, elles présentent également de nombreux avantages dont ont déjà découlé des actions sociétales concrètes dans les territoires. Quelques exemples sont donnés à travers des témoignages de chercheurs et de gestionnaires de l'environnement.

Limites

- Production potentielle de faux-positifs et de faux-négatifs, particulièrement lorsque les niveaux de précaution ne sont pas respectés
- Pas d'identification d'espèces hybrides ou d'occurrences d'introgessions génétiques
- Pas d'informations individuelles ni de quantification de l'abondance absolue des espèces détectées
- Étude limitée des espèces consommées, élevées, génétiquement proches ou pour lesquelles les bases de références génétiques sont incomplètes
- Délais d'obtention des résultats plus longs par rapport aux méthodes traditionnelles
- Production de déchets à usage unique

Avantages

- Méthode non invasive
- Étude de tous les règnes du vivant à partir d'un même échantillon
- Détection d'organismes difficilement observables par les méthodes classiques (faible densité, invisibles à l'œil nu, stades larvaires, etc.)
- Détection précoce d'espèces (exemple : espèces exotiques envahissantes)
- Facilité de mise en œuvre
- Réduction des biais liés aux conditions de terrain défavorables, à l'expérience de l'observateur et à la variabilité des efforts de prospection
- Possibilité de prospection de zones protégées, dangereuses ou polluées
- Possibilité de gain de temps lors des échantillonnages et donc un ratio coûts/rendements favorable

BIBLIOGRAPHIE

- Taberlet et al. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Ficetola et al. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Barnes & Turner. 2015. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Bruce et al. 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Pensoft*. <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>

Introduction⁰⁰

Pour faire face à l'ampleur et la rapidité de l'érosion de la biodiversité, une révolution dans le suivi et la prise en compte du monde vivant est nécessaire. Afin de répondre à ce défi planétaire, une méthode d'inventaire innovante et non invasive basée sur l'analyse de l'ADN environnemental (ADNe) est désormais accessible à tous les acteurs de la biodiversité. Grâce à cette approche performante et facilement déployable sur le terrain, il est possible d'étudier l'ensemble des règnes du vivant (des bactéries jusqu'aux grands mammifères) à partir d'un unique prélèvement environnemental (eau, sol, etc.), et d'améliorer le suivi d'espèces clés (protégées, menacées, exotiques envahissantes, etc.), cryptiques ou invisibles à l'œil nu. Les grands enjeux environnementaux (dérèglement climatique, pollutions, disparitions d'espèces, invasions biologiques, etc.) nécessitent des actions coordonnées à l'échelle mondiale sur le long terme. En ce sens, Vigilife propose à chacun de ses partenaires des protocoles standardisés, optimisés pour la détection d'espèces rares et validés scientifiquement à grande échelle (90 publications scientifiques) pour permettre de comparer efficacement les données collectées dans le temps et l'espace. Du fait de la difficulté d'accès inhérente aux écosystèmes marins, les inventaires de biodiversité et les suivis d'espèces dans ces milieux peuvent particulièrement bénéficier de cette technologie basée sur l'analyse de l'ADNe. En effet, bien qu'elles permettent de récolter des informations individuelles essentielles (âge, taille, sexe, etc.), les méthodes classiques de suivis visuels en plongée sous-marine sont souvent coûteuses et lourdes à mettre en place et les captures directes, telles que la pêche, sont invasives pour les écosystèmes et sont donc éthiquement discutables. Inversement, les méthodes issues de l'analyse de l'ADNe permettent de détecter des organismes généralement non recensés lors des suivis visuels et d'explorer des milieux difficilement accessibles.

“ Quand on ne connaît pas, on ne protège pas. ”

Ce document, fruit d'un travail collaboratif entre utilisateurs, chercheurs et experts, vise à présenter, de manière vulgarisée, la mise en œuvre pas à pas des standards Vigilife pour l'acquisition, la diffusion et l'interprétation de données issues d'ADNe pour encourager, à terme, la mise en place d'actions sociétales concrètes dans les territoires.

Madeleine Cancemi

PARTIE 01

01

Comprendre l'ADN environnemental





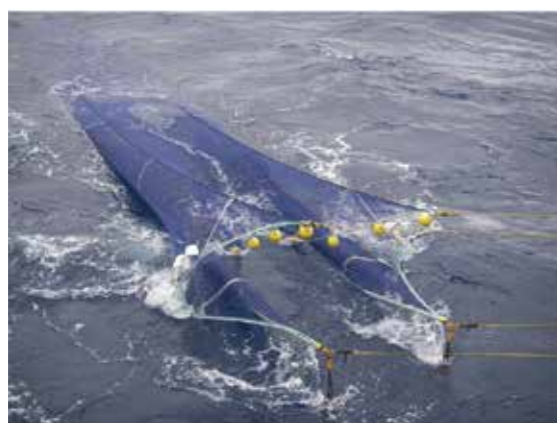
CHAPITRE 01

Contexte général⁰¹

Historique des méthodes de recensement de la biodiversité marine

En milieu marin, les méthodes dites conventionnelles (ou traditionnelles) de recensement de la biodiversité peuvent être classées en trois catégories : les méthodes par capture, les recensements visuels et l'hydroacoustique. Les méthodes par capture ont été les premières techniques développées pour réaliser des inventaires de la biodiversité marine et impliquent de prélever les individus dans leur environnement pour les dénombrer et les identifier *a posteriori*. Elles englobent diverses techniques de pêche telles que les chaluts, les filets, la pêche à la ligne, etc., ainsi que l'utilisation de produits létaux (comme la roténone) ou anesthésiants (comme l'eugénol). Bien qu'elles permettent de recueillir des échantillons biologiques et des informations individuelles importantes concernant la taille, l'âge, le sexe, l'état de santé et l'abondance des espèces, ces méthodes sont reconnues comme étant dommageables pour les écosystèmes. De plus, elles peuvent s'avérer complexes et coûteuses à mettre en œuvre en fonction de la densité et des caractéristiques biologiques et comportementales des espèces ciblées (par exemple, les méthodes de pêche sont difficilement applicables en milieu corallien).

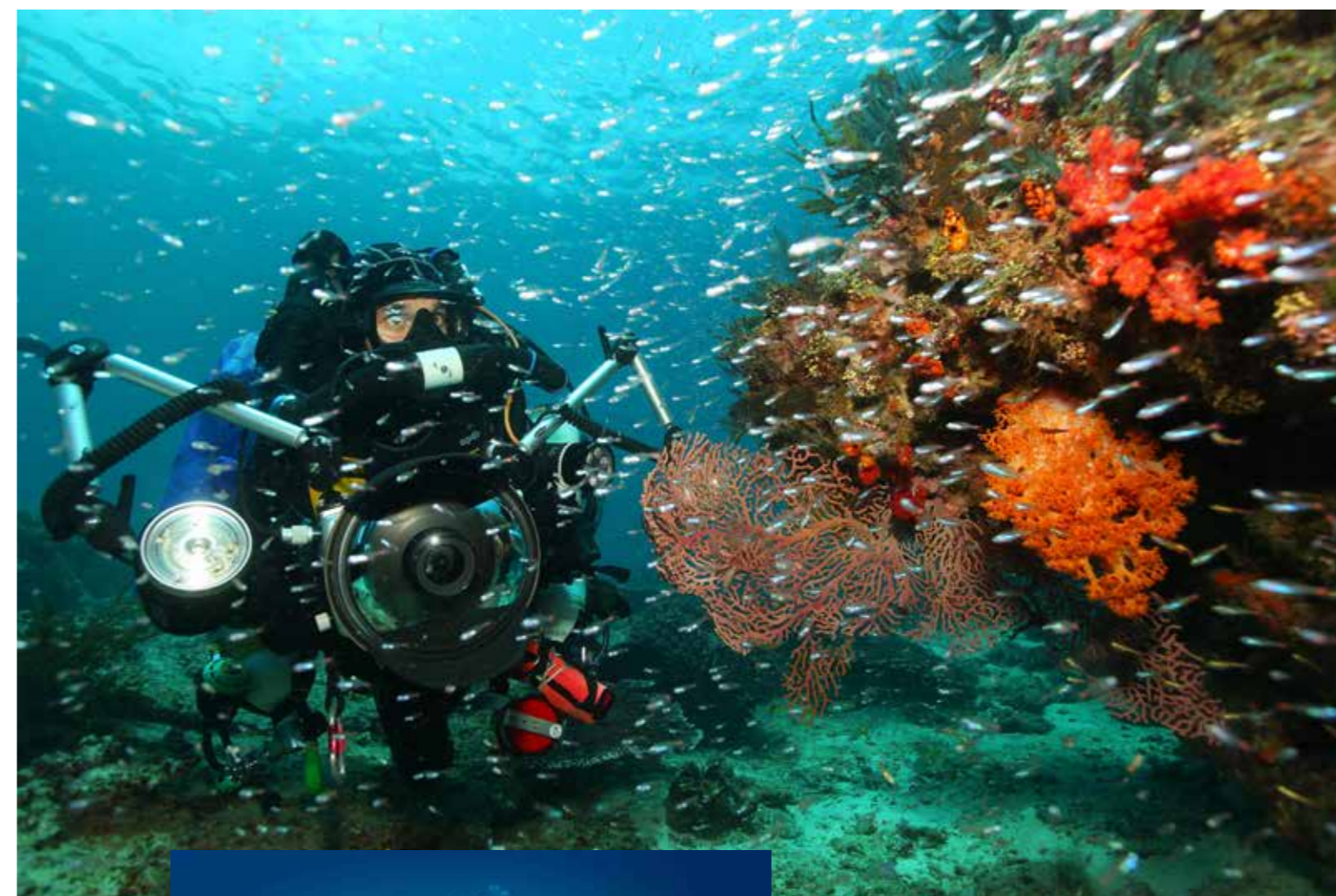
Les méthodes par capture ont été les premières techniques développées.



Pêche par chalutage © Ifremer



Pêche à la palangre



Recensement par photographie © IRD - Gilles Di Raimondo, Lengguru 2014



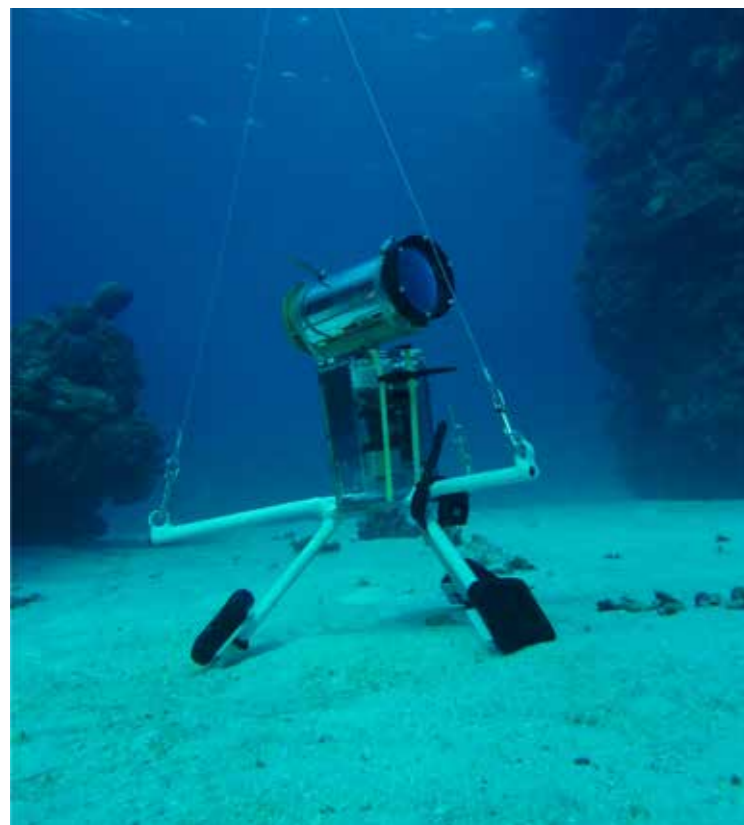
Recensement visuel © AMSA

Les recensements visuels consistent en des évaluations *in situ* de la biodiversité.

Les recensements visuels consistent en des évaluations *in situ* de la biodiversité. Les comptages visuels directs en plongée (ou UVC pour Underwater Visual Census), ou appuyés par des outils numériques tels que la vidéo ou la photographie, sont les plus couramment utilisés dans cette catégorie de méthodes. Tout comme les méthodes par capture, les recensements visuels fournissent des informations essentielles sur les individus (âge, taille, abondance, etc.) mais sont sujets à certaines caractéristiques biologiques et comportementales des espèces ciblées (comme les comportements d'évitement). Leur efficacité dépend du niveau d'expérience de l'observateur, de la présence des espèces sur le site d'observation, des conditions de visibilité (turbidité du milieu) ainsi que des spécificités de la zone prospectée (par exemple, pour des raisons logistiques et de sécurité, les observations visuelles directes en zones profondes ou portuaires sont complexes à mettre en œuvre).



CHAPITRE 01



Recensement par caméra © B. Preuss, Ifremer AMBIO project

Plus récemment, des méthodes basées sur l'hydroacoustique ont été développées pour surmonter les inconvénients des méthodes par capture en termes d'impact environnemental, ainsi que les limites des observations en termes de portée visuelle. Ces méthodes comprennent l'échosondage (qui repose sur la réflexion des ondes acoustiques), la bioacoustique (écoute passive des ondes sonores émises par les organismes) et la télémétrie (implantation d'émetteurs d'ondes acoustiques sous la peau des individus). Bien qu'elles puissent fournir des informations sur l'abondance et les comportements des organismes, la discrimination jusqu'au niveau de l'espèce peut être complexe, en particulier dans des zones présentant une grande biodiversité.



Télémétrie acoustique © Andromède Océanologie



S.A.S. Albert II de Monaco au contact des scientifiques - Mission Malpelo © Olivier Borde - Monaco Explorations

Pour aller plus loin ↗

Les Explorations de Monaco



Pour en savoir plus : Polanco et al. 2020. Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes Environmental DNA. <https://doi.org/10.1002/edn3.140>



Juhel et al. 2020. Detection of the elusive Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) using environmental DNA at Malpelo island (Eastern Pacific, Colombia). Ecology and Evolution. <https://doi.org/10.1002/ece3.7057>

Pour améliorer le suivi et la connaissance de la faune marine, l'analyse de l'ADNe a été déployée dans le cadre du cycle d'expéditions internationales « Explorations de Monaco », initié en 2017 par Son Altesse Sérénissime le Prince Albert II de Monaco. La technique a été mise en œuvre dans la plupart des sites visités (Colombie, Guadeloupe, Martinique, Méditerranée Occidentale, Nouvelle-Calédonie, etc.) et a permis d'effectuer de nombreuses découvertes. Parmi elles, l'identification de plus de 100 espèces de poissons lors des missions menées sur les récifs coralliens des Caraïbes (soit autant qu'en 20 ans de plongée sous-marine et de recensements visuels) et la détection de nombreux animaux rares, tels que le cachalot nain près de l'île de Malpelo.



© Laurent Ballesta, Andromède Océanologie

L'ADNe : Émergence, définition et applications

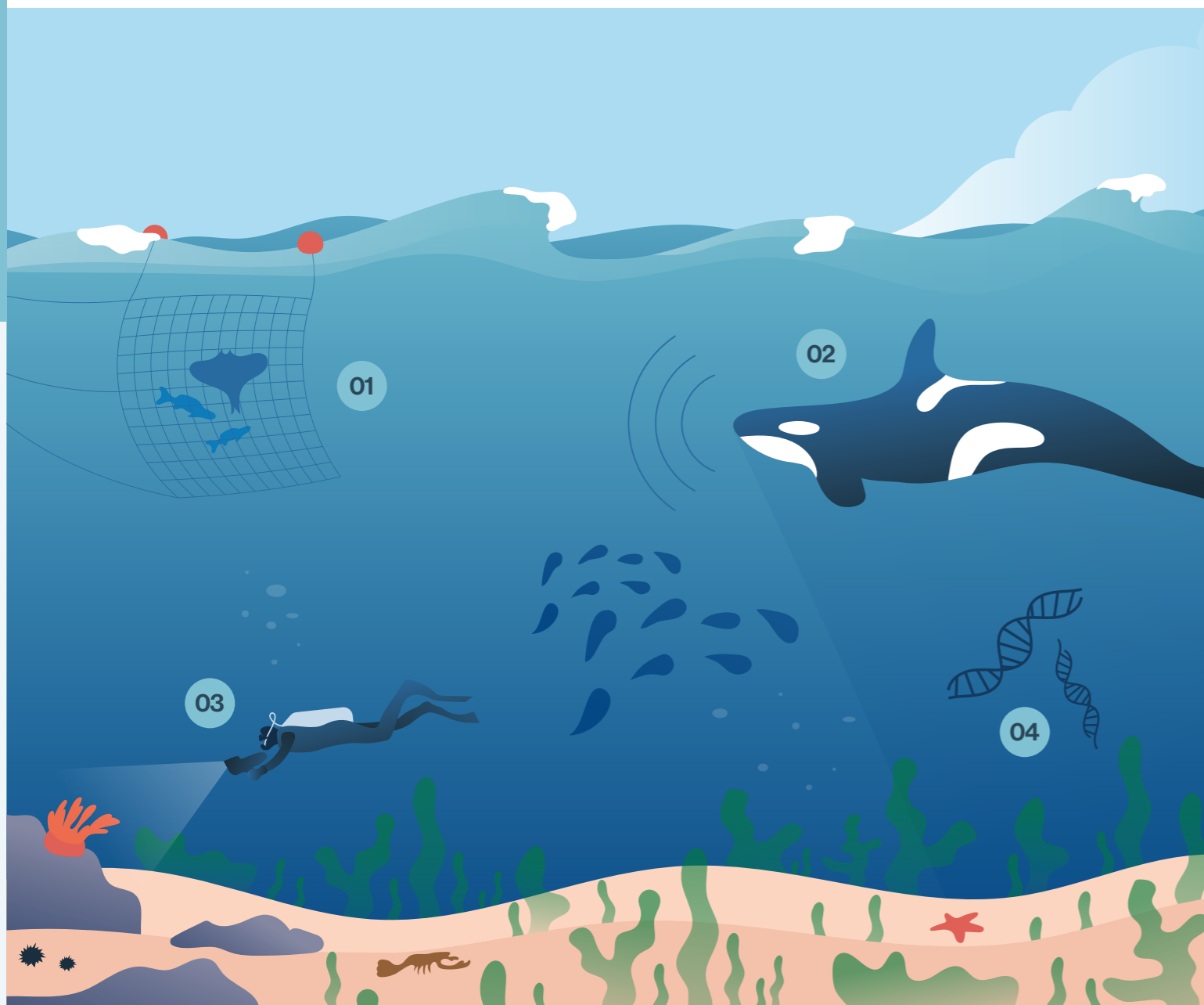
En 1987, le terme ADN environnemental* (ADNe) est employé pour la première fois pour désigner l'ADN microbien extrait à partir d'échantillons de sédiment¹. Son utilisation reste restreinte à la microbiologie, jusqu'en 2008 où une équipe du Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA, Unité Mixte de Recherche du CNRS, de l'Université de Grenoble et de l'Université Savoie Mont-Blanc) parvient à détecter la présence d'une espèce invasive, la Grenouille taureau *Aquarana catesbeiana*, dans plusieurs plans d'eau français grâce à la détection de traces de son ADN laissés dans l'environnement². Cette étude pionnière marque un tournant pour les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe qui voient leur champ d'applications s'élargir à la biologie de la conservation³. En effet, bien qu'étant une molécule universelle et commune à tous les êtres vivants, depuis les bactéries jusqu'aux macroorganismes les plus complexes, l'ADN contient également l'information génétique spécifique à chaque individu. Tous les organismes possèdent ainsi des séquences d'ADN propres dont ils laissent des traces dans leur environnement. L'analyse de ces « code-barres génétiques » (barcode en anglais), aussi appelés marqueurs, permet d'identifier les organismes présents dans un milieu donné, à la manière de la police scientifique capable d'identifier un coupable grâce aux traces d'ADN retrouvées sur une scène de crime. En milieu aquatique, il suffit de collecter un échantillon de plusieurs litres d'eau puis d'en extraire l'ADN. Deux approches principales peuvent ensuite être utilisées pour analyser ces extraits ADN : l'approche spécifique, permettant de détecter une espèce cible, ou l'approche multispécifique, aussi appelée metabarcoding de l'ADNe*.

Tous les organismes possèdent des séquences d'ADN propres dont ils laissent des traces dans leur environnement.

Vocabulaire

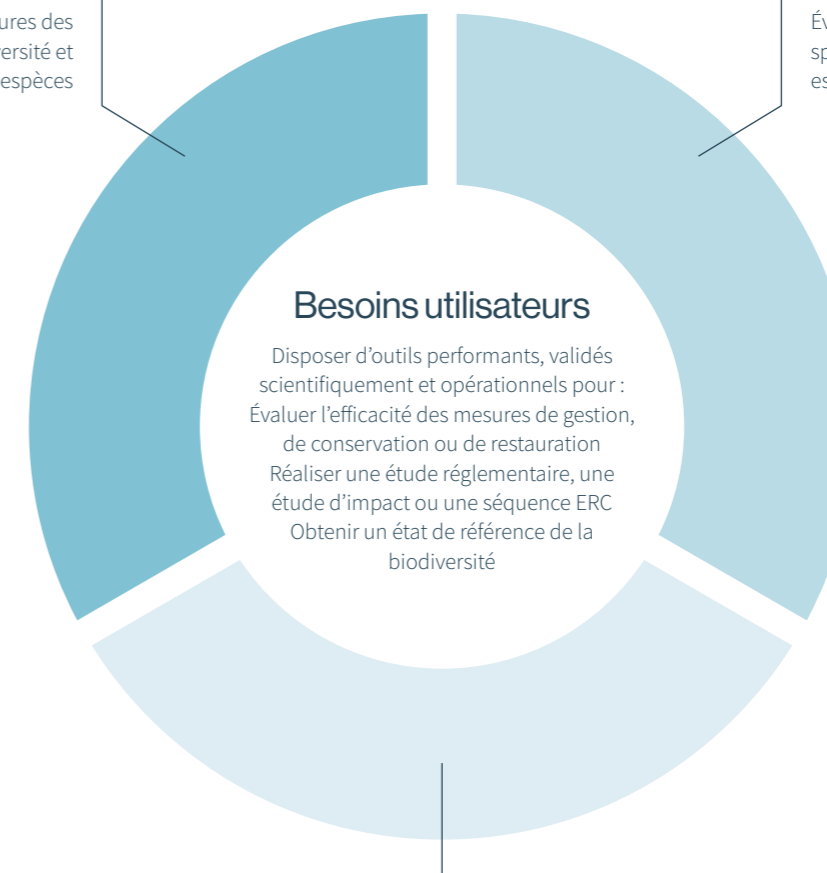
***ADN environnemental** : ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux tels que le sol, l'eau ou l'air, sans nécessiter d'isoler, au préalable, les organismes ciblés⁴.

***Metabarcoding de l'ADNe** : Technique permettant la détection simultanée et sans *a priori* de plusieurs espèces différentes appartenant à un même rang taxonomique⁴.



L'ADNe pour inventorier la biodiversité
Composition et structures des communautés. Diversité et richesse des espèces

L'ADNe pour le suivi de la biodiversité
Évolution des aires de répartition spatiales et temporelles des espèces. Scénarios prédictifs



L'ADNe pour détecter des espèces cibles
Détection précoce d'espèces pathogènes, invasives, parasites, etc. Mise en évidence d'espèces menacées, patrimoniales, etc.

- 01 MÉTHODES PAR CAPTURE**
Pêches, pièges, produits chimiques, etc.
- Applicable précisément à une espèce cible **+ -**
 - Applicable précisément à un groupe taxonomique cible **+**
 - Applicable simultanément à tous les règnes du vivant **-**
 - Fournit des données sur l'abondance des espèces **++**
 - Fournit des informations individuelles **++**
 - Évite de sacrifier les individus **-**
 - Préserve la tranquillité des écosystèmes **--**

- 03 RECENSEMENTS VISUELS**
Observations en plongées, photographies, vidéo, etc.
- Applicable précisément à une espèce cible **+**
 - Applicable précisément à un groupe taxonomique cible **++**
 - Applicable simultanément à tous les règnes du vivant **-**
 - Fournit des données sur l'abondance des espèces **++**
 - Fournit des informations individuelles **++**
 - Évite de sacrifier les individus **++**
 - Préserve la tranquillité des écosystèmes **-**

- 02 HYDROACOUSTIQUE**
Bioacoustique, échosondage, télémétrie, etc.
- Applicable précisément à une espèce cible **+ -**
 - Applicable précisément à un groupe taxonomique cible **++**
 - Applicable simultanément à tous les règnes du vivant **-**
 - Fournit des données sur l'abondance des espèces **+**
 - Fournit des informations individuelles **+ -**
 - Évite de sacrifier les individus **++**
 - Préserve la tranquillité des écosystèmes **+**

- 04 ADN ENVIRONNEMENTAL**
- Applicable précisément à une espèce cible **++**
 - Applicable précisément à un groupe taxonomique cible **++**
 - Applicable simultanément à tous les règnes du vivant **++**
 - Fournit des données sur l'abondance des espèces **+ -**
 - Fournit des informations individuelles **-**
 - Évite de sacrifier les individus **++**
 - Préserve la tranquillité des écosystèmes **++**

À retenir ↩

Aucune méthode d'inventaire n'est autosuffisante



Pour en savoir plus : Deter et al. 2023. 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. https://medtrix.fr/wp-content/uploads/2023/04/eREF-rapport2023_VF.pdf

Les techniques basées sur l'analyse de l'ADNe sont rapides, performantes, souvent moins onéreuses que les méthodes traditionnelles au regard des résultats obtenus, et surtout, sans impact sur l'écosystème étudié. Néanmoins, pour répondre à certaines questions écologiques (taille de la population, sexe, stade de développement, etc.), l'utilisation des méthodes d'inventaire plus traditionnelles reste indispensable. Par exemple, en mer Méditerranée, le projet eREF a montré que l'ADNe permettait d'inventorier les espèces cryptobenthiques (qui vivent cachées sur les fonds), pélagiques (qui vivent dans la colonne d'eau) et rares difficilement observables par les plongeurs, alors que l'UVC permettait d'identifier les espèces génétiquement proches partageant la même séquence d'ADN et d'estimer la taille et l'abondance des individus. La combinaison des deux approches peut donc être particulièrement intéressante pour inventorier la biodiversité et évaluer l'état des écosystèmes côtiers.

01 Contexte général



CHAPITRE 02

Écologie et détectabilité de l'ADNe⁰²

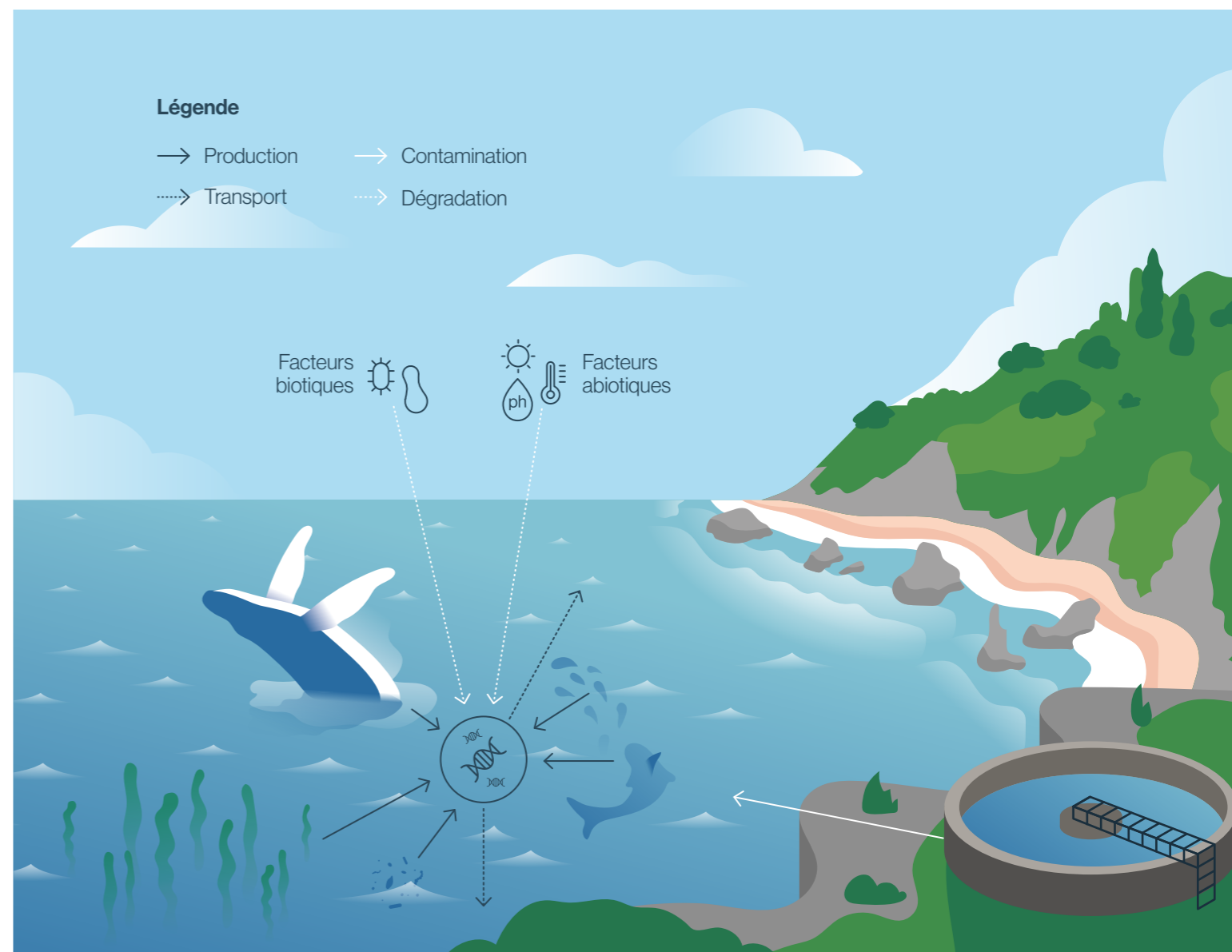
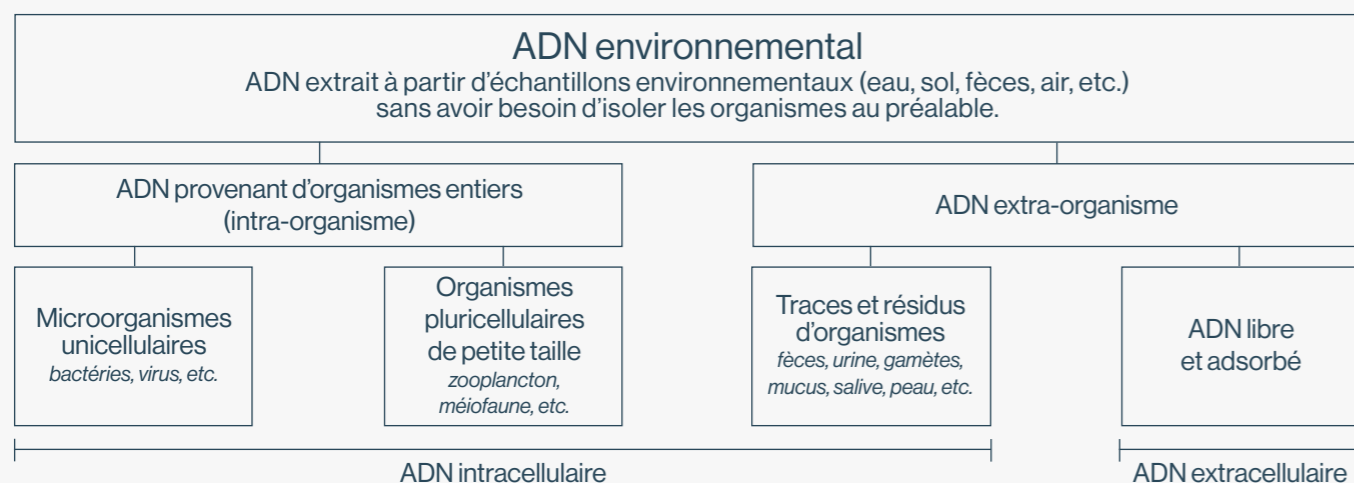
Écologie de l'ADNe : composition, origine, transport et dégradation

L'ADNe est composé d'ADN extracellulaire libre ou adsorbé sur des particules organiques et inorganiques, mais aussi d'ADN intracellulaire provenant de microorganismes unicellulaires (bactéries, virus ou protistes), d'organismes pluricellulaires de petites tailles et entiers (zooplancton ou méiofaune) ainsi que de traces et de résidus (fèces, urine, gamètes, mucus, salive, peau, etc.) d'organismes plus grands (vertébrés, invertébrés, plantes, etc.)^{3,5}. La quantité d'ADN produite par les organismes dépend de facteurs biologiques et physiologiques tels que l'âge, le stade de développement, le métabolisme, l'état de stress, le statut immunitaire, le

comportement de reproduction et la biomasse des individus. Elle dépend aussi de facteurs environnementaux comme la température, le pH et la salinité de l'eau^{6,7}. L'ADNe est dégradé par un ensemble de facteurs biotiques (microorganismes, enzymes, etc.) et abiotiques (rayons UV, pH, température, etc.). En milieu aquatique, il peut également être transporté ou sédimenté et remis en suspension dans la colonne d'eau^{6,7}

« Là où la vie passe, elle laisse des traces. »

Nicolas Poulet & Laurent Basilico, 2019



À retenir

Distance de détection et persistance de l'ADNe en milieu marin

En milieu marin, les vagues et les courants couplés à la dégradation de l'ADNe entraînent une dilution et une stratification verticale des molécules d'ADN résultant en des distances de détection relativement courtes⁹. En effet, il a été montré que l'ADNe pouvait être détecté de quelques dizaines à quelques centaines de mètres de sa source, permettant ainsi de distinguer des assemblages de communautés d'espèces sur des sites géographiquement proches^{10,11}. Une étude menée sur des carangues juvéniles (biomasse = 426,9 g) placées en cage pendant 48 h dans la baie de Maizuru, au Japon, a montré que la distance de détection du signal ADNe passait de 300 à 30 m seulement 1 h après le retrait des espèces et qu'il n'était plus détectable après 2 h¹¹. De manière générale, la 1/2 vie de l'ADNe en milieu marin est de l'ordre de quelques heures à 72 h environ^{12,13}. Il est important de noter que les durées de persistance de l'ADNe sont influencées par un ensemble de facteurs distincts dont les conditions environnementales, les quantités d'ADN produites (elles-mêmes soumises à la biologie des espèces ciblées), le type de milieu étudié ainsi que l'état (intracellulaire, extracellulaire, libre, adsorbé, etc.) et la taille des molécules d'ADNe (par exemple, des fragments longs et libres dans la colonne d'eau seront plus rapidement dégradés que des fragments courts et adsorbés). Des recherches supplémentaires sont donc requises pour une meilleure compréhension de ces phénomènes.

02 Écologie de l'ADNe



CHAPITRE 02

Des méthodes standardisées optimisées pour la détection d'ADNe rare

En milieu aquatique, la dégradation et le transport de l'ADNe dans l'eau impliquent qu'il est dilué dans des volumes importants et donc souvent présent en très faible quantité. Or, la détectabilité des espèces dépend d'abord de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu. Elle repose ensuite sur la conservation de l'ADNe récolté pour empêcher sa dégradation et ainsi assurer qu'une absence de détection n'est pas liée à une perte de matériel génétique au cours du processus d'analyse. En parallèle, les risques de contamination doivent être prévenus pour garantir que l'ADNe détecté est bien celui extrait à partir des échantillons environnementaux et non le résultat d'un apport extérieur (contamination). En effet, l'ADNe peut être transféré d'un échantillon à l'autre par l'intermédiaire du matériel utilisé et/ou des personnes le manipulant, ce qui peut entraîner la détection de faux-positifs*. Selon les objectifs de l'étude, ces différents paramètres - probabilité de détection, conservation et absence de contamination - impliquent des niveaux de précautions plus ou moins contraignants en termes de matériel, d'infrastructures, d'échantillonnage et d'analyses en laboratoire. Par exemple, dans le cas d'analyses

de communautés bactériennes abondantes dans l'environnement, les niveaux de précaution à prendre ne sont pas aussi drastiques que pour détecter des espèces menacées et rares laissant des traces infimes de leur ADN dans l'environnement. Pour réaliser des inventaires et des suivis de biodiversité, il est bien souvent nécessaire de prendre en compte ces espèces moins communes afin d'obtenir les listes d'espèces les plus exhaustives possibles tout en limitant les risques de faux-négatifs* et de faux-positifs* pouvant avoir des conséquences non négligeables sur les interprétations en aval. Les méthodes déployées dans le cadre de Vigilife sont développées depuis 2011 par l'entreprise SPYGEN et sont optimisées pour maximiser la détectabilité des espèces. Elles sont également standardisées pour permettre de comparer les données récoltées dans le temps et dans l'espace.

Vocabulaire

***Faux-négatif :** Absence de détection d'une espèce présente dans l'environnement étudié.

***Faux-positif :** Détection d'une espèce absente de l'environnement étudié.

Prévenir les contaminations extérieures garantit que l'ADN détecté est celui extrait à partir des échantillons environnementaux et limite ainsi les risques de faux-positifs.

Plus l'effort d'échantillonnage est important, plus la probabilité de prélever l'ADN des espèces ciblées augmente.

Prévenir la dégradation de l'ADN récolté garantit qu'une absence de détection n'est pas liée à la perte de l'ADN au cours de l'analyse et limite ainsi les risques de faux-négatifs.

À la manière d'un tirage aléatoire, la détectabilité des espèces dépend d'abord de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu.

01 Niveau de précaution 1

Biomonitoring des diatomées, analyse de communautés procaryotiques, etc.

Par exemple : séparation physique des analyses, port de gants et d'une blouse au laboratoire, contrôles négatifs, etc.

02 Niveau de précaution 2

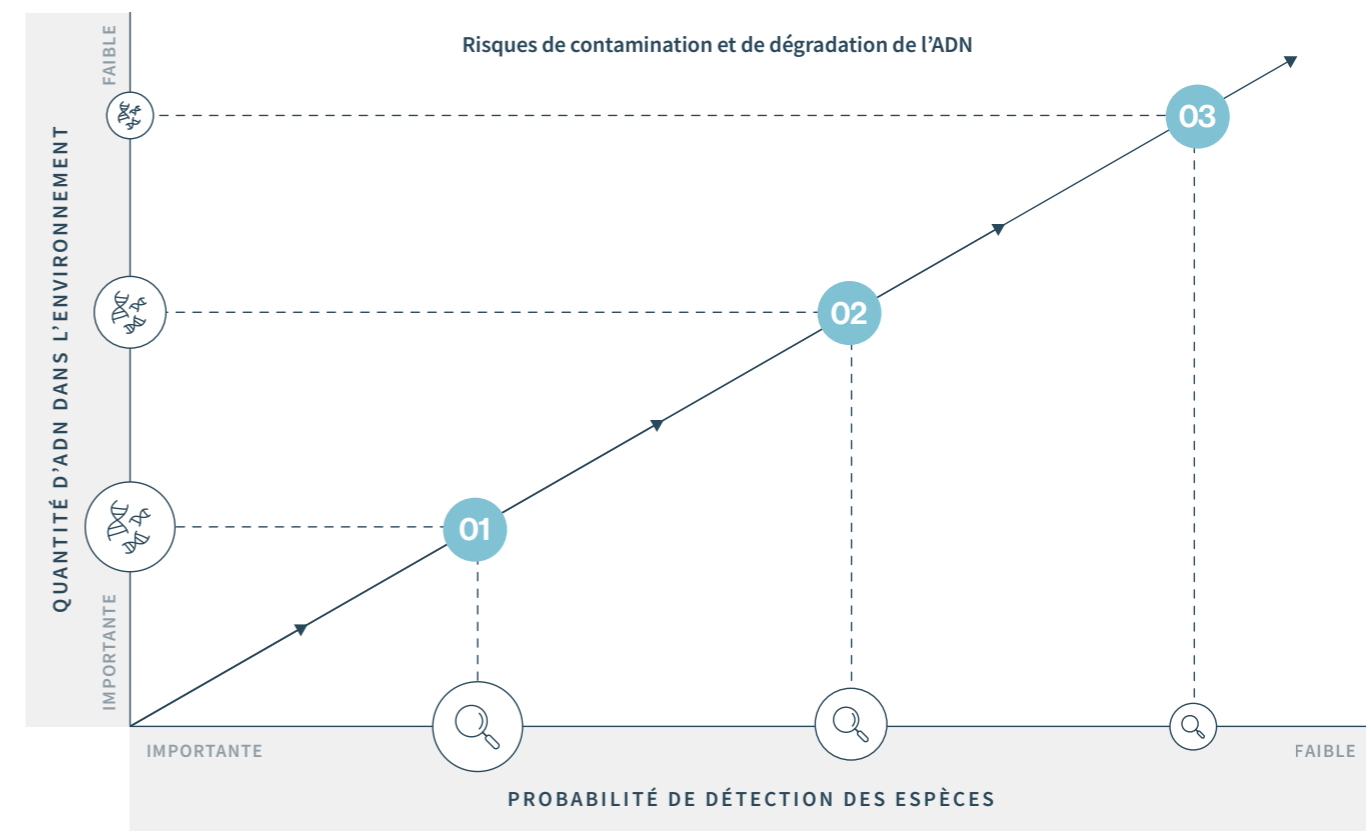
Inventaire d'espèces communes, régimes alimentaires à partir de fèces, composition floristique du miel, etc.

Par exemple : Salle dédiée à l'analyse de faibles quantités d'ADN, port d'un masque chirurgical lors des analyses au laboratoire, décontamination fréquente, etc.

03 Niveau de précaution 3

Analyse d'espèces rares menacées, détection précoce d'espèces exotiques envahissantes ou pathogènes, analyse globale de communautés, etc.

Par exemple : Salle dédiée à l'analyse de très faibles quantités d'ADN, pressurisation des laboratoires et filtration de l'air, port d'une combinaison, d'une double paire de gants, de sur-chaussures, d'une charlotte, etc.



• TYPE D'ÉCHANTILLONS CONCERNÉS

Eau • Sol • Bulk* • Miel • Fèces

*Le terme bulk désigne l'ADN massal, c'est-à-dire l'ADN extrait à partir d'homogénéat de communautés capturées (exemple : invertébrés, diatomées, etc.). L'appartenance de l'ADN massal à l'ADN environnemental est débattu au sein de la communauté scientifique.

PARTIE 02

02

Acquérir des données issues de l'ADNe



CHAPITRE 03

Concevoir un projet ⁰³

Comme pour tout projet scientifique, lors de la conception d'une étude basée sur l'analyse de l'ADNe, l'utilisateur doit, dans un premier temps, identifier un ou plusieurs objectifs à atteindre ; puis, les moyens humains, logistiques et financiers disponibles et nécessaires pour réaliser les échantillonnages et les analyses. Ces différents paramètres sont sources de contraintes techniques et environnementales qui conditionnent, entre autres, l'élaboration d'une stratégie d'échantillonnage optimale, c'est-à-dire d'un plan de collecte des échantillons permettant de maximiser la détection du signal ADNe, de réduire l'effort d'échantillonnage et de limiter les risques de biais, tout en restant représentatif du milieu étudié.

Définir l'objectif de l'étude

L'objectif d'une étude basée sur l'analyse de l'ADNe est défini en fonction de la ou des question(s) posée(s) par l'utilisateur ainsi que par les taxons et les zones géographiques ciblés. Ainsi, une étude peut aussi bien concerner une espèce cible unique (qu'elle soit considérée comme vulnérable, emblématique, envahissante, etc.) qu'un ou plusieurs groupe(s) taxonomique(s) (poissons, crustacés, vertébrés, etc.) et être conduite à l'échelle locale lorsqu'elle concerne un site unique (zone de restauration écologique, port, chantier naval, etc.) ou à l'échelle globale si plusieurs localisations différentes sont impliquées (comparaison d'espèces colonisant des zones protégées ou non, des zones fortement anthropisées ou non, etc.).

“ Un protocole est toujours construit pour répondre à une question.

Sordello et al. 2019

Identifier les acteurs à mobiliser

Lors de la réalisation d'un projet faisant appel aux méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe, une même personne peut assurer plusieurs rôles et intervenir à différentes étapes. Par exemple, le commanditaire de l'étude peut réaliser l'échantillonnage, transmettre les données sur les plateformes dédiées et assurer l'expertise écologique.



Commanditaire

Chef de projets, gestionnaire, chercheur, etc.
En charge de l'étude, il identifie les objectifs et peut participer à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage. Il assure le respect des réglementations, l'opérationnalisation technique et financière du projet ainsi que la diffusion et l'utilisation des résultats.

Expert écologue

Il peut participer à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage et réalise les interprétations écologiques des résultats obtenus par l'expert technologique.



projet

Échantillonneur

Il se forme et assure les prélèvements, le conditionnement et l'envoi des échantillons ainsi que l'acquisition d'informations relatives à l'échantillonnage (lieu, date, heure, éventuels problèmes rencontrés, etc.).



Gestionnaire de données

Il assure la qualité et la structuration des données et des métadonnées dans les bases de données et systèmes d'information.



Expert technologique

Laboratoire d'analyse, laboratoire de recherche, etc.

Il peut aider à l'élaboration de la stratégie d'échantillonnage, réalise les analyses et valide les résultats obtenus au laboratoire. Dans le cadre des projets Vigilife, l'expert technologique est l'entreprise SPYGEN.



Paroles d'expert ↙

L'importance de la validité statistique des données



Aurélien Besnard,
Directeur d'études de l'École Pratique
des Hautes Études (Montpellier)

Tout comme l'étude de la distribution des espèces et des facteurs pouvant l'influencer à partir de simples observations de terrain, l'utilisation des techniques d'ADNe implique de bien réfléchir au plan d'échantillonnage spatial à déployer. Ainsi, une définition claire de la question d'intérêt et de la population statistique afférente est nécessaire afin de déployer un échantillonnage spatial rigoureux pour réaliser des inférences en cohérence avec la question étudiée. Par ailleurs, même si la probabilité de détection *via* l'ADNe est haute, des problèmes de faux-négatifs sont fréquents et impliquent de bien réfléchir à la manière de modéliser cette détection pour obtenir des estimations non biaisées des paramètres. La définition de tels plans d'échantillonnage robustes est cruciale pour l'exploitation des données. Elle implique de mobiliser des compétences en statistiques relativement pointues. Nous encourageons donc les porteurs de projet à travailler de concert avec des écostatisticiens qui pourront les guider sur la définition de tels plans.

CHAPITRE 03

Anticiper les ressources financières et les délais à allouer

Le budget est un point clé à prendre en compte lors de l'élaboration d'un projet. En effet, des ressources financières limitées par rapport aux besoins de l'utilisateur peuvent influencer la stratégie d'échantillonnage en modulant, par exemple, le nombre de sites prospectés ou le nombre d'échantillons prélevés. Ainsi, bien que ce ne soit pas toujours possible, nous recommandons d'élaborer une stratégie d'échantillonnage en amont de la demande de financement, en collaboration avec les experts identifiés. À titre informatif, à l'heure actuelle, le coût moyen d'une analyse pour un échantillon peut atteindre plusieurs centaines d'euros. Les tarifs varient selon le groupe taxonomique ciblé mais aussi selon le matériel d'échantillonnage proposé et les analyses réalisées par l'expert technologique sélectionné. En effet, chaque laboratoire déploie une méthode propre, plus ou moins adaptée aux objectifs définis par l'utilisateur (Cf. chapitre 2). Généralement, les prix communiqués par l'expert technologique n'incluent pas les potentiels frais liés à l'interprétation écologique des résultats et aux moyens à la mer nécessaires pour réaliser les échantillonnages. Ils devront néanmoins être pris en compte dans le budget final.

Lors de la conception d'un projet, il est également important de se renseigner auprès de l'expert technologique quant au temps nécessaire pour obtenir les résultats. Il dépend essentiellement de la charge de travail du laboratoire, du nombre d'échantillons à analyser et de l'approche méthodologique déployée (spécifique ou multispécifique). Ainsi, les délais d'obtention des résultats peuvent s'étendre sur plusieurs mois. Un temps supplémentaire peut aussi être requis pour l'étape d'interprétation écologique.



© Greg Lecoeur, WE ARE MEDITERRANÉE

Élaborer une stratégie d'échantillonnage

En amont de la réalisation des prélèvements, la stratégie d'échantillonnage permet de déterminer le nombre d'échantillons à collecter, leur répartition dans le temps et l'espace ainsi que les méthodes et les réglementations à respecter. Elle répond ainsi à quatre questions clés :

- Comment échantillonner ?
- Où échantillonner ?
- Quand échantillonner ?
- Selon quelles réglementations en vigueur ?

Traditionnellement, deux méthodes existent pour collecter l'ADNe à partir d'un échantillon d'eau : la précipitation de l'ADN par ajout d'éthanol et d'acétate de sodium ou la filtration de l'eau à travers une membrane poreuse retenant l'ADN. A l'heure actuelle, cette 2^{de} méthode est la plus utilisée¹⁴ car elle est reconnue par la communauté scientifique comme étant plus performante¹⁵. En effet, elle permet d'analyser de plus grands volumes d'eau tout en limitant l'usage d'éthanol – produit inflammable, soumis à des réglementations strictes et souvent coûteuses en termes de transport, de conservation et d'utilisation¹⁵.

À retenir ↩

Filtration vs. précipitation

03 Concevoir un projet

Filtration hors site

Filtration sur site
© Greg Lecoeur,
WE ARE MEDITERRANÉEPompe manuelle
© SPYGENPompe motorisée
© Greg Lecoeur,
WE ARE MEDITERRANÉEFiltre plat ouvert
© MicrobeOnlineCapsule de filtration
© Greg Lecoeur,
WE ARE MEDITERRANÉE

Comment échantillonner ?

→ CHOISIR UNE MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE

La collecte d'échantillons en milieu aquatique consiste à prélever plusieurs litres d'eau. Bien qu'il existe de nombreuses méthodes permettant de réaliser ce type de prélèvements¹⁴, toutes ne sont pas optimisées pour la détection d'ADNe rare (comprendre ADNe présent en faible quantité, Cf. chapitre 2). Les principales méthodes existantes sont brièvement présentées ici.

L'eau peut être filtrée directement sur site ou être prélevée dans des contenants spécifiques pour ensuite être transportée à terre puis filtrée au laboratoire. Les filtrations réalisées en dehors du site de prélèvement limitent le temps passé sur le terrain. Cependant, le transport et la manipulation des échantillons augmentent, respectivement, les risques de contamination et de dégradation de l'ADNe. Pour limiter ce second phénomène, les échantillons d'eau peuvent être conservés au froid ou par ajout d'une solution tampon, ce qui engendre des contraintes logistiques et financières non négligeables, limitant les volumes d'eau pouvant être analysés¹⁵.

“ Une bonne stratégie d'échantillonnage est avant tout un compromis optimisé entre une question et un ensemble de contraintes.

Giraudoux, 2004

CHAPITRE 03

Qu'elles soient effectuées hors site ou sur site, les filtrations peuvent être réalisées avec une pompe manuelle (type seringue) ou motorisée (péristaltique ou à vide). Les pompes manuelles sont faciles à utiliser et peu onéreuses mais les filtrations peuvent être laborieuses et chronophages, limitant ainsi les volumes d'eau et le nombre d'échantillons analysés¹⁵.

Les pompes manuelles et motorisées peuvent être utilisées avec des membranes filtrantes (également mentionnées par le terme "filtre" dans ce document) ouvertes ou encapsulées et composées de fibre de verre, de nitrocellulose ou de polymères de plastique (polycarbonate, polyéthersulfone, etc.). Ces divers matériaux sont susceptibles d'influencer l'hydrophilie de la membrane ainsi que ses propriétés mécaniques et sa capacité de résistance (capacité à résister à différentes pressions de filtration, temps de conservation supportés, etc.), ensemble de paramètres pouvant moduler les volumes d'eau filtrés^{14,15}. Ces derniers dépendent également de la porosité et de la surface du filtre. En effet, le diamètre des pores doit être suffisamment petit pour retenir le plus d'ADNe possible tout en limitant la saturation de la membrane (colmatage) due à l'accumulation d'autres particules organiques et inorganiques. Généralement, les filtres ont une porosité inférieure à 1,5 µm et les plus utilisés sont de l'ordre de 0,22 µm et 0,45 µm^{14,15}. En milieu marin, où l'ADNe est souvent dilué et l'environnement est oligotrophe (pauvre en matière organique) et peu turbide, des membranes avec une petite porosité sont préconisées¹⁵.

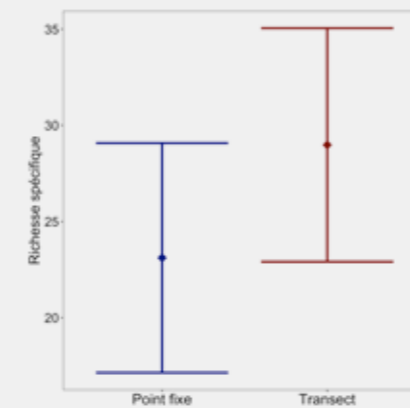
Les filtres ouverts sont moins onéreux mais nécessitent d'être manipulés par l'utilisateur et sont exposés à l'air libre au cours de la filtration. Leur utilisation augmente donc le risque de contamination des échantillons (risque de faux-positifs). De plus, ils ont une surface réduite par rapport aux membranes encapsulées, ce qui limite les volumes d'eau pouvant être filtrés (colmatage plus rapide).

Après filtration, l'ADNe retenu sur la membrane peut être dégradé par des phénomènes physico-chimiques ou par les communautés microbiennes présentes à la surface. Afin de prévenir ces risques de dégradation, les filtres doivent être conservés rapidement, au froid ou dans des solutions de conservation (tampons, éthanol, etc.) et à l'abri de la lumière. Le choix de la méthode dépend du type de membrane utilisée (ouverte ou encapsulée). Ainsi, les filtres ouverts peuvent être conservés au froid ou dans des solutions de conservation. En revanche, seule l'utilisation de solutions de conservation est indiquée dans le cas de filtres encapsulés. Le choix de la solution de conservation dépend de la méthode d'extraction de l'ADN utilisée lors des analyses au laboratoire.

Pour aller plus loin ↗

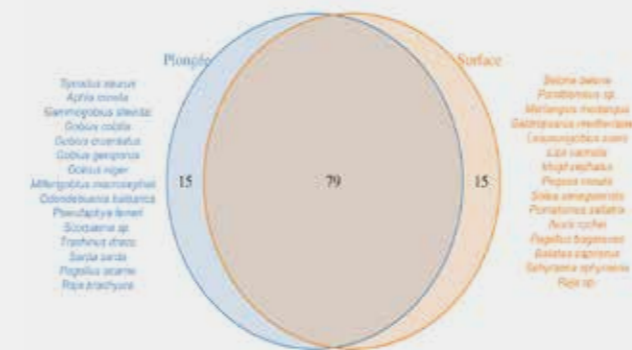
Point fixe vs. transect

Le déplacement de la pompe lors de la filtration permet de couvrir une zone plus étendue. Le projet eREF¹⁸ a montré que l'échantillonnage par transect en plongée (transects de l'ordre de quelques centaines de mètres) permettait d'identifier plus d'espèces que lors d'une filtration sur point fixe. Cependant, dans les deux cas, les communautés mises en évidence sont semblables. Un échantillonnage sans déplacement est donc représentatif des espèces présentes dans la zone même s'il limite le nombre d'espèces identifiées par rapport à la méthode par transect.



Surface vs. profondeur

Le projet eREF¹⁸ a comparé les espèces de poissons mises en évidence lors d'échantillonnages réalisés simultanément en surface (1 m de profondeur) et en profondeur (50 cm au-dessus du substrat, de 9 à 18 m de profondeur). Les deux méthodes permettent de détecter des communautés de poissons relativement similaires. Cependant, bien que l'échantillonnage de surface soit suffisant pour identifier un grand nombre d'espèces benthiques, l'échantillonnage en plongée, au plus près du substrat, permet d'identifier plus d'espèces de fond.



Pour en savoir plus : Deter et al. 2023. 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. https://medtrix.fr/wp-content/uploads/2023/04/eREF-rapport2023_VF.pdf

→ POINT FIXE ET TRANSECTS

Selon les objectifs de l'étude et les espèces ciblées ainsi que la surface et la profondeur de la zone géographique d'intérêt, les filtrations peuvent être réalisées sur un transect ou sur un point fixe ou, en d'autres termes, avec ou sans déplacement de la pompe. Dans le cas de la réalisation d'un transect, la longueur de celui-ci dépend des moyens logistiques à disposition (bateau motorisé ou non, plongeur avec scooter sous-marin ou avec palmes), de l'étendue du secteur à couvrir et des objectifs de l'étude. Par exemple, si l'objectif est de localiser précisément la présence d'une espèce dans une zone restreinte, mieux vaut effectuer plusieurs transects courts afin de maximiser la probabilité de détection et de localiser précisément la source du signal. Inversement, si l'objectif est d'avoir une idée générale de la biodiversité présente dans une réserve de plusieurs kilomètres carrés, des transects longs seront préférables afin de garantir la couverture spatiale de l'échantillonnage. La filtration sur point fixe peut être employée dans le cas où l'étude se concentre sur un site spécifique, de faible profondeur et où d'autres méthodes de recensement de la biodiversité sont déployées en complément des analyses de l'ADNe.

→ SURFACE ET PROFONDEUR

En point fixe ou en transect, la filtration peut être réalisée en surface (moins de 1 m de profondeur), à bord d'une embarcation motorisée ou non, ou en profondeur (jusqu'à 50 cm du fond) à l'aide d'une pompe étanche ou d'une bouteille de prélèvement (type Niskin). En milieu marin, le signal ADNe étant largement dilué et potentiellement soumis à une stratification verticale (Cf. chapitre 2), le choix d'un échantillonnage en surface ou en profondeur est déterminé par le type de taxon d'intérêt et par la profondeur du site d'étude. Par exemple, pour les organismes cryptobenthiques (qui vivent cachés sur le fond), une filtration proche du substrat est préconisée, alors qu'une filtration dans la colonne d'eau permet d'identifier efficacement les espèces pélagiques. De même, si la zone étudiée est de faible profondeur (zone côtière, plateforme off-shore, etc.), un échantillonnage en surface peut être suffisant car le brassage de la colonne d'eau par les vagues et les marées permettent de ramener l'ADNe en surface. En revanche, il est nécessaire d'échantillonner en profondeur si le site d'intérêt est profond (récif profond, zone de forage, etc.). En effet, au-delà de 20 m, l'échantillonnage de surface ne permet pas de détecter efficacement les espèces profondes et les assemblages mis en évidence diffèrent. Même avec un déplacement limité, l'échantillonnage de l'ADNe en plongée permet d'identifier un plus grand nombre d'espèces, sans doute en raison de la proximité immédiate du substrat et des espèces les plus benthiques. Enfin, un échantillonnage à différentes profondeurs peut être intéressant si l'on veut identifier l'ensemble des espèces présentes dans une zone incluant un gradient bathymétrique (exemple : aires protégées).

À retenir ↵

Les standards Vigilife



À la manière d'un tirage aléatoire, la détectabilité des espèces dépend d'abord de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu. Cependant, en milieu aquatique, les phénomènes liés à l'écologie de l'ADNe (production, composition, dégradation et transport) impliquent qu'il est dilué dans des volumes importants et donc souvent présent en faibles concentrations (Cf. chapitre 2). Ces dernières tendent à être particulièrement faibles en milieu marin et dans le cas d'occurrence d'espèces rares, peu abondantes dans l'environnement. En conséquence, les quantités d'eau filtrées tendent à être positivement corrélées avec les quantités d'ADNe récoltées et donc avec les probabilités de détection des espèces¹⁵⁻¹⁷. Ainsi, dans le cadre d'inventaires et de suivis de la biodiversité, où la production de faux-négatifs et de faux-positifs peut avoir des conséquences non négligeables (Cf. chapitre 2), nous recommandons de filtrer les plus grands volumes d'eau possible. Cet objectif peut être atteint en augmentant le nombre d'échantillons prélevés sur un même site d'étude, en augmentant les volumes filtrés par échantillon (ce qui implique d'utiliser du matériel adapté) ou en combinant les deux approches.

Les méthodes déployées dans le cadre de Vigilife sont optimisées pour maximiser la détectabilité des traces d'ADN laissées par les organismes dans l'environnement y compris celles des espèces rares (menacées et/ou en faible densité). Elles consistent à filtrer directement sur le site d'échantillonnage plusieurs dizaines de litres d'eau (à raison d'environ 1 L/min pendant environ 30 minutes) à l'aide d'une pompe motorisée péristaltique munie d'une capsule de filtration renfermant une membrane d'une porosité égale à 0,2 µm. Une fois la filtration terminée, du tampon de conservation est versé dans la capsule de filtration afin de recouvrir tout le filtre et ainsi préserver l'ADNe retenu dessus jusqu'à son extraction au laboratoire.

03 Concevoir un projet

CHAPITRE 03

→ NOMBRE D'ÉCHANTILLONS

Afin de filtrer les plus grands volumes d'eau possibles et d'augmenter la probabilité de détection de l'ADN des espèces ciblées, plusieurs échantillons, appelés répliques, peuvent être collectés sur un même site de prélèvement. Le nombre de répliques prélevés peut être déterminé à la suite d'une étude pilote et/ou selon les taxons ciblés, les caractéristiques du milieu et les objectifs de l'étude. En milieu marin, l'ADNe est fortement dilué (Cf. chapitre 2) et il est donc nécessaire d'effectuer plusieurs répliques. Nous recommandons d'effectuer *a minima* deux répliques terrain par site d'échantillonnage.

Où échantillonner ?

En tenant compte de l'écologie de l'ADNe en milieu marin (Cf. chapitre 2), l'espacement horizontal entre les sites d'échantillonnage dépend à la fois des besoins de l'utilisateur et des caractéristiques de la zone (superficie à étudier, renouvellement des eaux, présence de forts courants, discontinuité de l'habitat, etc.). Par exemple, lorsque l'objectif est de détecter une espèce cible, on peut effectuer un échantillonnage continu le long de l'habitat (transects courts bout à bout) afin de maximiser la superficie prospectée. Inversement, lorsque l'objectif est de comparer les assemblages d'espèces entre plusieurs sites (exemple : dans et hors d'une zone protégée ou anthropisée), la distance entre ces derniers doit être suffisamment grande pour les discriminer. Typiquement, nous recommandons que les sites soient espacés d'une distance au moins double de la longueur du transect. En cas de filtration sans déplacement, une distance minimale de 1 km devra séparer les sites. Il est également important de respecter la cohérence des habitats et des profondeurs entre les sites pour pouvoir comparer leur biodiversité et d'éviter de potentielles sources de contamination relarguant de l'ADNe (distance minimale de 1 km avec les stations d'épuration, les rejets aquacoles, etc. s'ils ne sont pas l'objet de l'étude).

Quand échantillonner ?

Le moment idéal de l'échantillonnage doit être défini selon les caractéristiques du milieu et des espèces associées. Par exemple, lorsqu'une espèce particulière est ciblée, il est recommandé d'échantillonner durant sa période de reproduction et/ou d'activité (en prenant garde à ne pas déranger les individus qui pourraient être rencontrés) car l'espèce excrète plus d'ADN à ce moment-là (production de gamètes, mise bas, etc.). Selon le cycle de vie des espèces, celles-ci ne sont pas forcément présentes aux mêmes endroits tout au long de l'année (exemple : flux migratoire). Il est donc utile d'obtenir des informations préalables sur la répartition et l'écologie des taxons d'intérêt pour déterminer la période d'échantillonnage la plus favorable. En zone tempérée, avec des saisons très marquées, les assemblages d'espèces peuvent fortement varier au cours de l'année. Lorsque l'on réalise des inventaires de biodiversité, il est donc important d'échantillonner à la même période tous les sites que l'on veut comparer. De même, bien que les changements globaux actuels compliquent la tâche, les échantillonnages pluriannuels doivent être effectués à la même période chaque année pour être comparables. Pour réaliser un inventaire le plus exhaustif possible des espèces présentes dans une zone sur l'ensemble de l'année, il faut idéalement effectuer plusieurs échantillonnages à différentes saisons afin de maximiser la détection des espèces qui ne sont présentes qu'à certaines périodes. On peut, par exemple, effectuer un échantillonnage au printemps et un autre à l'automne.



Bouteille de prélèvement
© INRAE Thonon, JC Hustache

Bien que les prélèvements d'eau réalisés avec une bouteille de prélèvement type Niskin ne nécessitent pas de solliciter un plongeur ni d'être muni d'une pompe étanche, le projet eREF¹⁸ a montré que cette méthode d'échantillonnage était moins adaptée que des filtrations réalisées en profondeur. En effet, les prélèvements d'eau étant manipulés en surface et la décontamination complète de la bouteille étant impossible, les risques de contamination augmentent. De plus, la bouteille doit être descendue ouverte jusqu'à la profondeur désirée où les bouchons sont alors fermés pour prélever l'eau. L'échantillon est donc susceptible de contenir de l'ADNe issu de la colonne d'eau et prélevé au cours de la descente.



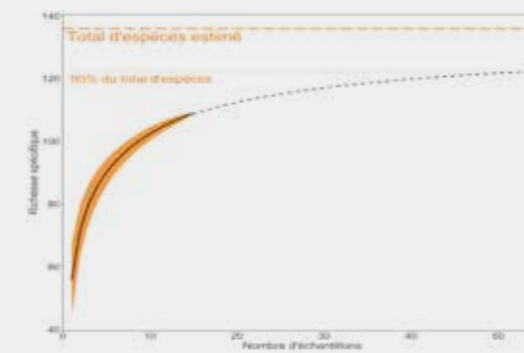
Pour en savoir plus : Deter et al. 2023. eREF : État de référence de la biodiversité en Vertébrés dans les masses d'eaux côtières méditerranéennes à partir d'ADN environnemental. Rapport final. 68 pages et annexes. https://medtrix.fr/wp-content/uploads/2023/04/eREF-rapport2023_VF.pdf

Pour aller plus loin ↗

Nombre de répliques terrain

Les résultats du projet eREF¹⁸ montrent que dans une réserve marine intégrale où la diversité et la densité des poissons est élevée, plus de 50 répliques de 30 L sont nécessaires pour réaliser un inventaire complet des espèces. La stratégie d'échantillonnage doit donc être déterminée pour répondre à un compromis entre exhaustivité des espèces détectées, coûts et moyens à disposition.

Dans le cadre d'un inventaire de la biodiversité, les résultats issus de différents répliques prélevés sur un même site pourront être regroupés pour obtenir la liste d'espèces la plus exhaustive possible. Cependant, si des analyses statistiques doivent être réalisées en aval, il peut être nécessaire d'analyser les répliques séparément afin de garantir la robustesse des analyses.



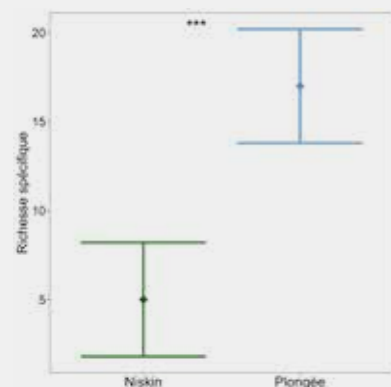
Pour en savoir plus : Deter et al. 2023. eREF : État de référence de la biodiversité en Vertébrés dans les masses d'eaux côtières méditerranéennes à partir d'ADN environnemental. Rapport final. 68 pages et annexes. https://medtrix.fr/wp-content/uploads/2023/04/eREF-rapport2023_VF.pdf

Selon quelles réglementations échantillonner ?

Avant de réaliser une campagne d'échantillonnage, il est important de vérifier que l'ensemble des autorisations nécessaires au bon déroulement des prélèvements et de l'acheminement des échantillons ainsi que du matériel aient été obtenues. Au niveau international, l'Accès aux ressources génétiques et le Partage juste et équitable des Avantages découlant de leur utilisation (APA) est encadré par le protocole de Nagoya, adopté en 2010 lors de la 10^{ème} Conférence des Parties contractantes à la Convention sur la Diversité Biologique (pour plus d'informations : <https://absch.cbd.int/fr/>). Cependant, en France métropolitaine (les procédures peuvent potentiellement s'appliquer dans certaines zones d'Outre-Mer et à l'étranger), les échantillonnages réalisés pour des études basées sur l'analyse de l'ADNe et conduites à des fins d'inventaires de biodiversité ne rentrent pas dans le cadre de ces accords (source : article L412-4 du code de l'environnement). Les prélèvements d'eau de mer sont tout de même réglementés et nécessitent de se rapprocher des autorités compétentes à l'échelle de chaque pays. Par exemple, en France, une demande d'autorisation RSM (Recherche Scientifique Marine), décrivant les objectifs de l'étude, les méthodes employées et les moyens à la mer utilisés, doit être déposée auprès de la Préfecture maritime. Dans le cas d'un échantillonnage réalisé dans des Aires Marines Protégées (AMP), l'accord des gestionnaires de la zone devra également être obtenu. A l'étranger, toute activité maritime nécessite généralement une demande auprès d'un ou plusieurs ministère(s), selon le pays concerné et la méthode utilisée (par exemple, il est souvent plus simple d'effectuer des prélèvements en surface plutôt qu'avec un plongeur immergé). Les modalités de transport du matériel d'échantillonnage (batteries lithium pour les pompes, produits chimiques, etc.) et des échantillons (exemple : capsules de filtration) peuvent également être soumises à des réglementations douanières propres à chaque pays.

Pour aller plus loin ↗

L'échantillonnage en profondeur



Stratégie d'échantillonnage adaptée à une question posée

COMMENT ?

- Grands volumes d'eau standardisés
- Filtration sur site
- Pompe motorisée
- Filtre encapsulé (0,2µm)
- Tampon de conservation
- Point fixe ou transect
- Surface ou profondeur
- A minima 2 répliques

OÙ ?

- Transects distants de 2 fois la longueur du transect
- Points fixes espacés d'au moins 1 km
- Éviter les zones susceptibles de relarguer des grandes quantités d'ADN non ciblé (stations d'épuration, rejets aquacoles, etc.)

QUAND ?

- Selon l'écologie des espèces ciblées lorsque les quantités d'ADN relarguées sont maximales
- Selon les saisons et les conditions environnementales

RÉGLEMENTATIONS

- Demander les autorisations de prélèvements
- S'informer des réglementations douanières en vigueur

CHAPITRE 04

Réaliser un échantillonnage⁰⁴

Les méthodes déployées dans le cadre de Viglife ont été développées par les entreprises SPYGEN et Andromède Océanologie ainsi que par l'UMR MARine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC) et le Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) de l'Université de Montpellier. Ces protocoles, optimisés pour la détection de l'ADNe rare, nécessitent l'utilisation de kits d'échantillonnage ainsi que de différents types de pompes de filtration. Ce chapitre présente l'ensemble de ces éléments.



© Greg Lecoeur, WE ARE MEDITERRANÉE



Capsule de filtration, bouchons et tampon de conservation © SPYGEN



Tuyau muni d'une crépine et paire de gants © SPYGEN

Matériel préconisé

→ KITS D'ÉCHANTILLONNAGE

L'entreprise SPYGEN propose des kits d'échantillonnage VigiDNA®, à usage unique et composés d'un tuyau muni d'une crépine, d'une capsule de filtration stérile à faible porosité (0,2 µm), d'un tampon de conservation (CL1) ainsi que de paires de gants.

L'assemblage du tuyau sur la capsule de filtration doit être effectué selon le sens indiqué (dans le sens du courant de filtration) et dans un environnement propre, préalablement décontaminé. La crépine et la sortie de la capsule doivent être protégées (par exemple, à l'intérieur d'un gant fourni avec le kit d'échantillonnage) jusqu'au moment de la filtration.

→ POMPES PÉRISTALTIQUES

Le kit d'échantillonnage est utilisé en association avec une pompe péristaltique permettant de faire passer l'eau à travers le filtre contenu dans la capsule de filtration. Selon la profondeur d'échantillonnage souhaitée (Cf. chapitre 3), différentes pompes sont utilisées. Les échantillons de surface peuvent être prélevés à l'aide d'une pompe péristaltique de type Athena® (Proactive Environmental Products LLC, Bradenton, Florida, USA) placée sur le bateau alors qu'une pompe étanche est nécessaire pour les échantillons profonds afin de réaliser la filtration sous l'eau.



Fixation du tuyau sur la capsule de filtration © Greg Lecoeur, WE ARE MEDITERRANÉE

À retenir ↵

limiter les risques de contamination

Pour tout échantillonnage effectué, le port de gants propres est indispensable lors de la manipulation de la pompe, des kits de filtration et de la crépine. Les surfaces en contact avec le matériel doivent également être nettoyées à l'aide d'un produit décontaminant type javel (au moins 2,5 % de javel active). Afin de limiter la détection de l'ADN d'espèces non présentes sur site, il est recommandé d'éviter de filtrer dans le sillage de l'embarcation et de ne pas échantillonner à bord d'un bateau de pêche.

04 Réaliser un échantillonnage

CHAPITRE 04

Protocoles recommandés

→ PRÉLÈVEMENTS EN SURFACE

Lors de l'échantillonnage en surface, la pompe et la capsule de filtration restent à bord de l'embarcation alors que la crépine est immergée entre 0,5 et 1m de profondeur à l'aide d'un plomb. L'eau est pompée à travers la crépine et remonte le tuyau pour passer à travers le filtre encapsulé avant d'être rejetée. Selon l'objectif de l'étude, la filtration se fait en avançant sur un transect ou à l'arrêt sur un point fixe (Cf. chapitre 3).

→ PRÉLÈVEMENTS EN PROFONDEUR

La filtration profonde suit la même procédure que celle de surface, mais la pompe, la capsule de filtration, le tuyau et la crépine sont totalement immergés. Pour cela, l'ensemble peut être descendu à la profondeur souhaitée par un plongeur ou par un système lesté, équilibré, adapté à la pompe et pouvant être tracté ou non selon la méthode d'échantillonnage choisie (point fixe ou transect, Cf. chapitre 3). Dans le premier cas, pour assurer la sécurité du plongeur, la durée de filtration est adaptée afin de limiter les temps de décompression. Dans le second cas de figure d'utilisation d'un système lesté, il est nécessaire de connaître la bathymétrie et la nature du fond afin de ne pas endommager le matériel utilisé. En effet, la pompe doit pouvoir suivre le relief du fond pour que la crépine soit suffisamment proche du substrat sans le toucher.

Pour aller plus loin ↗

L'échantillonnage en milieu très profond

L'échantillonnage en milieu très profond (zone mésophotique ou rariphotique, plus de 150 m) est un challenge technique en raison des conditions extrêmes de pression et de l'impossibilité d'y envoyer un opérateur pour effectuer la filtration. Pour s'affranchir de ces limites, une pompe «très profonde» a été développée par l'entreprise Andromède Océanologie et l'université de Montpellier (MARBEC) afin d'effectuer des filtrations directement à la profondeur d'échantillonnage, ce qui limite le risque de contamination liée à la manipulation de l'eau en surface. Cette pompe est équipée d'un minuteur et d'un détecteur de pression afin de déclencher la filtration de manière programmée à une profondeur donnée et avec un temps de latence défini par l'utilisateur. Cette méthode de filtration nécessite un système permettant de descendre et de remonter la pompe à plusieurs centaines de mètres de profondeur, ce qui impose de fortes contraintes techniques. L'entreprise Andromède Océanologie a mis au point un système d'immersion permettant de filtrer jusqu'à 1500 m de profondeur à bord d'un bateau équipé d'un treuil hydraulique. Les kits d'échantillonnage conjointement utilisés avec cette pompe restent identiques à ceux décrits précédemment (capsule de filtration, tuyaux, crépine, tampon de conservation, gants). Cependant, les capsules et les tuyaux doivent être préalablement remplis d'eau ultra pure afin d'évacuer tout l'air du système et éviter les problèmes de contraction de volume liés à l'augmentation de pression en profondeur.



Filtration en surface © Abbie Trayler-Smith, Greenpeace



Filtration en surface © Greg Lecoeur, WE ARE MÉDITERRANÉE



© Abbie Trayler-Smith, Greenpeace

Conservation des échantillons et données à récolter

Une fois la filtration terminée, l'opérateur, muni de gants propres, détache la capsule de filtration du tuyau pour évacuer l'eau de mer résiduelle et fermer l'une des extrémités de la capsule à l'aide d'un des bouchons fournis avec le kit d'échantillonnage. La capsule est alors entièrement remplie avec le tampon de conservation fourni. Après avoir fixé un second bouchon, elle doit ensuite être vigoureusement agitée dans toutes les directions, pendant au moins une minute pour assurer une répartition uniforme de la solution de conservation et éliminer les éventuelles bulles introduites lors de l'ajout du tampon. Cette étape permet également de détacher la matière organique présente sur la membrane et garantit que la totalité de l'ADNe capté soit immergée dans la solution de conservation. Jusqu'aux analyses réalisées au laboratoire, les capsules doivent être conservées verticalement (membrane orientée vers le bas), à température ambiante et à l'abri de la lumière. Parallèlement, l'opérateur doit consigner divers paramètres liés à l'échantillonnage tels que la durée de filtration ainsi que la date, les coordonnées GPS et le nom du site de prélèvement (Cf. chapitre 6). Nous préconisons également de recenser tous les éléments remarquables survenus lors de la filtration (par exemple : observation d'espèces).



Filtration en profondeur © Laurent Ballesta, Andromède Océanologie

À retenir ↶

Limiter les risques de contamination

04 Réaliser un échantillonnage

Le plongeur doit se positionner au-dessus de la pompe et la crépine être orientée vers le fond afin de limiter la filtration d'ADN humain venant de l'opérateur. Le néoprène des combinaisons de plongée est également une source potentielle de contamination, il est donc conseillé de ne pas utiliser une combinaison habituellement employée pour des activités de type pêche sous-marine.

CHAPITRE 05

Analyses laboratoire et bio- informatique⁰⁵



© Spygen

À retenir ↵

Contraintes laboratoires liées à l'étude de l'ADNe rare

Lorsque l'ADNe rare est analysé, il est indispensable de garantir que l'ADN extrait et amplifié à partir d'un échantillon environnemental n'est pas lié à une contamination. Le laboratoire partenaire ou prestataire doit donc utiliser des méthodes et techniques appropriées. Dans un premier temps, la plateforme d'analyse doit être composée de plusieurs salles afin de garantir une séparation physique des étapes pré et post PCR (la PCR, pour Polymerase Chain Reaction en anglais, est une étape d'amplification de l'ADN). Ainsi, les salles dédiées à la préparation du matériel et à l'extraction d'ADN (pré-PCR, où l'ADN est rare) doivent être maintenues en surpression afin d'éviter l'entrée de contaminants extérieurs. Elles doivent également être équipées d'un sas d'entrée permettant au personnel de s'équiper avec du matériel dédié et à usage unique (charlotte, masques, double paire de gants, combinaison, chaussures dédiées, sur-chaussures). Inversement, les salles destinées à l'amplification de l'ADN et au séquençage (post-PCR, où l'ADN est abondant) ne nécessitent pas de sas d'entrée mais doivent être placées en dépression ou isolées dans des infrastructures séparées (par exemple, bâtiments ou étages séparés) afin d'éviter une contamination des autres salles par l'ADN présent en très forte concentration. Cela est également garanti par l'utilisation de matériel adapté type hottes (hotte à flux laminaire ou hotte PCR). Un renouvellement régulier de l'air doit être appliqué dans toutes les salles afin d'évacuer l'ADN qui pourrait s'y accumuler et le flux de travail doit être unidirectionnel. En d'autres termes, un système de marche en avant doit être mis en place et respecté au sein du laboratoire. Ainsi, le matériel et le personnel iront toujours de la salle où l'ADN est le moins concentré (exemple : salle de préparation du matériel) vers la salle où l'ADN est le plus concentré (exemple : salle post-amplification). Une décontamination régulière des laboratoires doit être effectuée à l'aide d'un agent destructeur de l'ADN (exemple : javel) et les surfaces et matériels doivent être décontaminés entre chaque série d'échantillons. Enfin, il est important de s'assurer que des contrôles qualité soient effectués au cours du processus d'analyse des échantillons (contrôles négatifs à chaque étape). Sans le respect de l'ensemble de ces exigences, il est impossible d'éviter les contaminations croisées et de s'assurer de la qualité du travail réalisé au laboratoire lorsque le nombre d'échantillons analysés devient important.

05 Analyses laboratoire
et bioinformatique

CHAPITRE 05

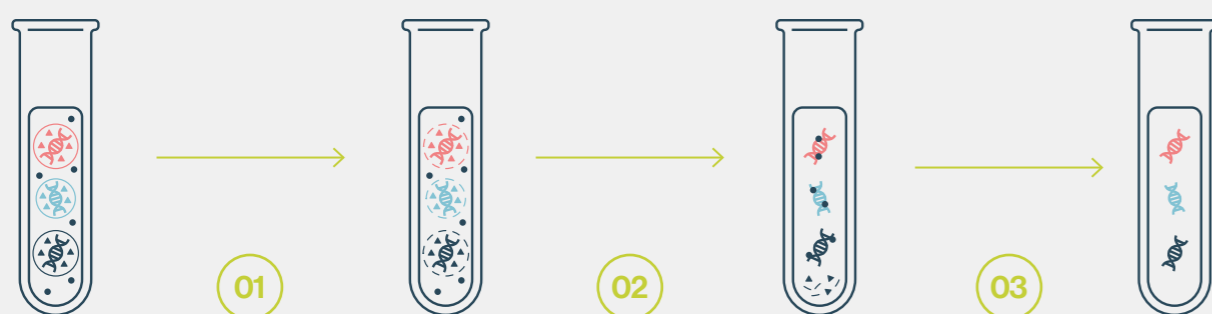
Extraction de l'ADNe

L'extraction permet d'isoler l'ADNe contenu dans les échantillons environnementaux préalablement collectés³. Elle se compose de quatre étapes principales¹⁹ – lyse, clarification, lavages et élution – pouvant être réalisées à l'aide de protocoles personnalisés (type phénol-chloroforme) ou de kits commerciaux^{3,14,15}. Indépendamment de la méthode mise en œuvre, l'ADN extrait peut ensuite être analysé pour détecter une espèce cible par approche spécifique ou pour étudier plusieurs espèces appartenant à un même groupe taxonomique par approche multispécifique ou metabarcoding de l'ADNe.

Détection d'une espèce cible par approche spécifique

L'approche spécifique consiste à révéler la présence d'une espèce d'intérêt par détection d'une séquence précise de son ADN. En effet, si cette séquence, aussi appelée marqueur génétique, est présente dans l'échantillon, elle peut être ciblée grâce à des amorces, consistant en de courtes séquences synthétiques d'ADN, puis amplifiée par polymérisation en chaîne (PCR). D'autres méthodes dérivées de la PCR, telles que la qPCR (PCR quantitative) ou la dPCR (PCR digitale), peuvent également être utilisées pour amplifier et quantifier le fragment génétique de l'espèce recherchée.

Extraction

01
LYSE

Les membranes cellulaires sont détruites par méthodes mécaniques (broyage), chimiques (solvants) et/ou enzymatiques (protéinases).

02
CLARIFICATION

L'ADN est séparé des composants cellulaires et solubilisé.

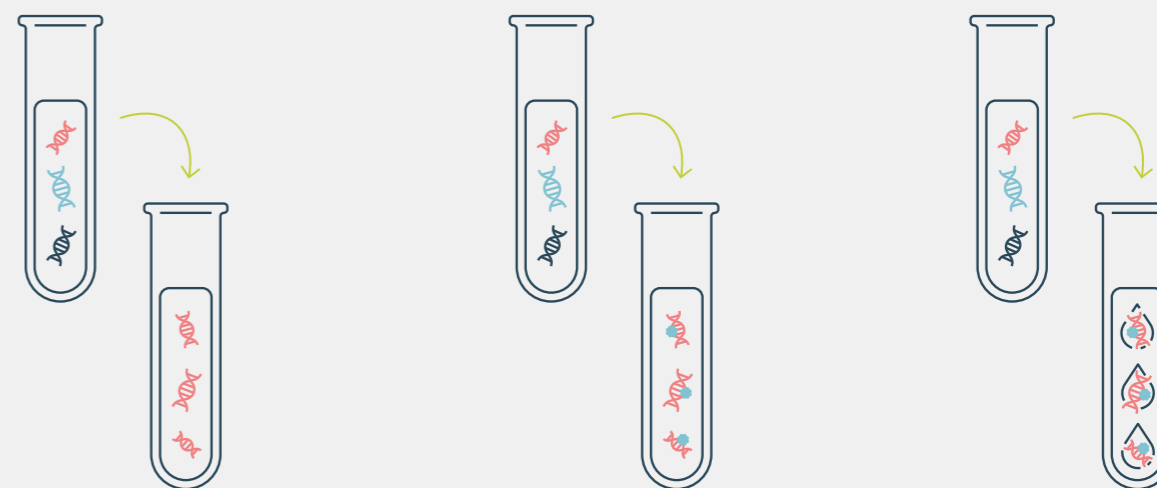
03
LAVAGES ET ÉLUTION

Les substances organiques et inorganiques résiduelles sont éliminées par lavages successifs (éthanol ou tampons). L'ADN ainsi purifié est resolubilisé.

- Membranes cellulaires avant lyse
- Membranes cellulaires lysées
- ▲ Protéines
- Composants organiques et inorganiques résiduels

Approche spécifique

ÉTUDE D'UNE ESPÈCE CIBLE



PCR CONVENTIONNELLE

Amplification et détection par présence – absence de l'ADN de l'espèce cible

La PCR est une méthode d'amplification d'un fragment spécifique d'ADN permettant d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Dans le cadre de l'approche spécifique, les résultats sont visualisés par migration des fragments d'ADN amplifiés sur un gel d'agarose maintenu sous l'effet d'un champ électrique (électrophorèse)

PCR QUANTITATIVE

Amplification et quantification de l'ADN de l'espèce cible

La PCR quantitative, ou qPCR, est une méthode dérivée de la PCR se basant sur la mesure d'un signal fluorescent émis lors de l'amplification du fragment d'ADN ciblé. Les résultats sont visualisés informatiquement.

PCR DIGITALE

Amplification et quantification de l'ADN de l'espèce cible

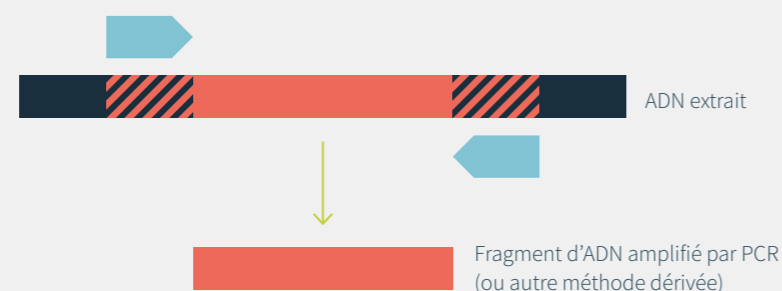
La PCR digitale, ou dPCR, est une méthode dérivée de la qPCR où le mélange réactionnel est fractionné en milliers de microréactions. Les résultats sont visualisés informatiquement.

La réaction PCR (PCR conventionnelle et méthodes dérivées) se compose de plusieurs cycles d'amplification. Chaque cycle comporte 3 étapes : une phase de dénaturation de l'ADN (l'ADN double brin est séparé en 2 brins distincts), une phase d'hybridation des amorces et une phase de synthèse de l'ADN complémentaire.



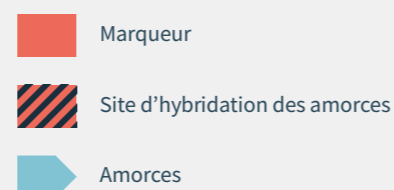
CHAPITRE 05

Vocabulaire



***Marqueur :** Région spécifique et connue de l'ADN ayant une localisation précise dans le génome (par exemple, un gène ou une partie d'un gène).

***Amorces :** Courtes séquences synthétiques d'ADN permettant de cibler un marqueur génétique et d'initier son amplification par PCR (ou autres méthodes dérivées).



À retenir

Kits commerciaux ou méthodes personnalisées

Les kits commerciaux garantissent la standardisation et limitent les risques de contamination des produits et du matériel utilisés tout en réduisant les risques liés à la santé et à la sécurité du personnel de laboratoire. Leur utilisation est donc recommandée pour garantir la reproductibilité des résultats, dans le cadre d'études réglementaires ou industrielles réalisées de façon régulière et à haut débit¹⁵. Néanmoins, de nombreux kits sont aujourd'hui disponibles sur le marché et leur efficacité est dépendante du matériel de filtration choisi (filtre plat ou encapsulé), de la méthode de conservation associée, des organismes ciblés ainsi que des caractéristiques du milieu (par exemple, la présence de composés organiques ou inorganiques résiduels peut inhiber les étapes laboratoires réalisées en aval s'ils ne sont pas éliminés correctement)¹⁵. Un kit d'extraction doit donc être sélectionné selon le matériel utilisé en amont et les objectifs de l'utilisateur. Afin de limiter les risques de contamination, nous préconisons également de choisir une méthode limitant les temps d'exposition des échantillons à l'air libre (par exemple, les échantillons sont maintenus ouverts pendant toute la durée de l'extraction, lorsqu'une méthode d'extraction sans centrifugation et utilisant une chambre à vide est mise en œuvre).

À retenir

PCR conventionnelle, quantitative ou digitale

A l'heure actuelle, la qPCR est la méthode la plus couramment utilisée car elle est plus fiable que la PCR conventionnelle, dont l'interprétation des résultats peut être sujette à la subjectivité de l'opérateur, et permet l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons sur un même temps d'analyse que la dPCR^{15,20}. Indépendamment de la méthode employée, les résultats peuvent être influencés par les réactifs et les appareils (appelés thermocycleurs) utilisés. Par exemple, pour la qPCR, le signal fluorescent nécessaire à la quantification des brins d'ADN peut être émis par une molécule intercalante de l'ADN (type SYBR green) ou par une sonde fluorogénique (fluorochrome associé à une courte séquence synthétique d'ADN appelée sonde et permettant de cibler une région spécifique du marqueur, le fluorochrome n'est libéré que si la sonde s'associe à l'ADN ciblé, exemple : Taqman)¹⁵. L'utilisation d'une sonde fluorogénique réduit les risques de faux-positifs (Cf. chapitre 2) tout en augmentant les capacités de détection et de quantification de la qPCR^{15,20}.

Nombre de cycles PCR

Plus le nombre de cycles PCR réalisés est important, plus le nombre de molécules d'ADN amplifiées augmente. Dans le cas d'inventaires et de suivis de la biodiversité, nécessitant la prise en compte de l'ADNe rare, nous recommandons d'effectuer entre 40 et 50 cycles PCR (dans le cas d'études de communautés plus abondantes, comme les bactéries, 25 à 35 cycles PCR suffisent). Ces valeurs favorisent l'amplification de l'ADN rare mais augmentent également les risques de contamination et de détection de faux-positifs. Elles nécessitent donc des niveaux de précaution importants.

Nombre de répliques PCR

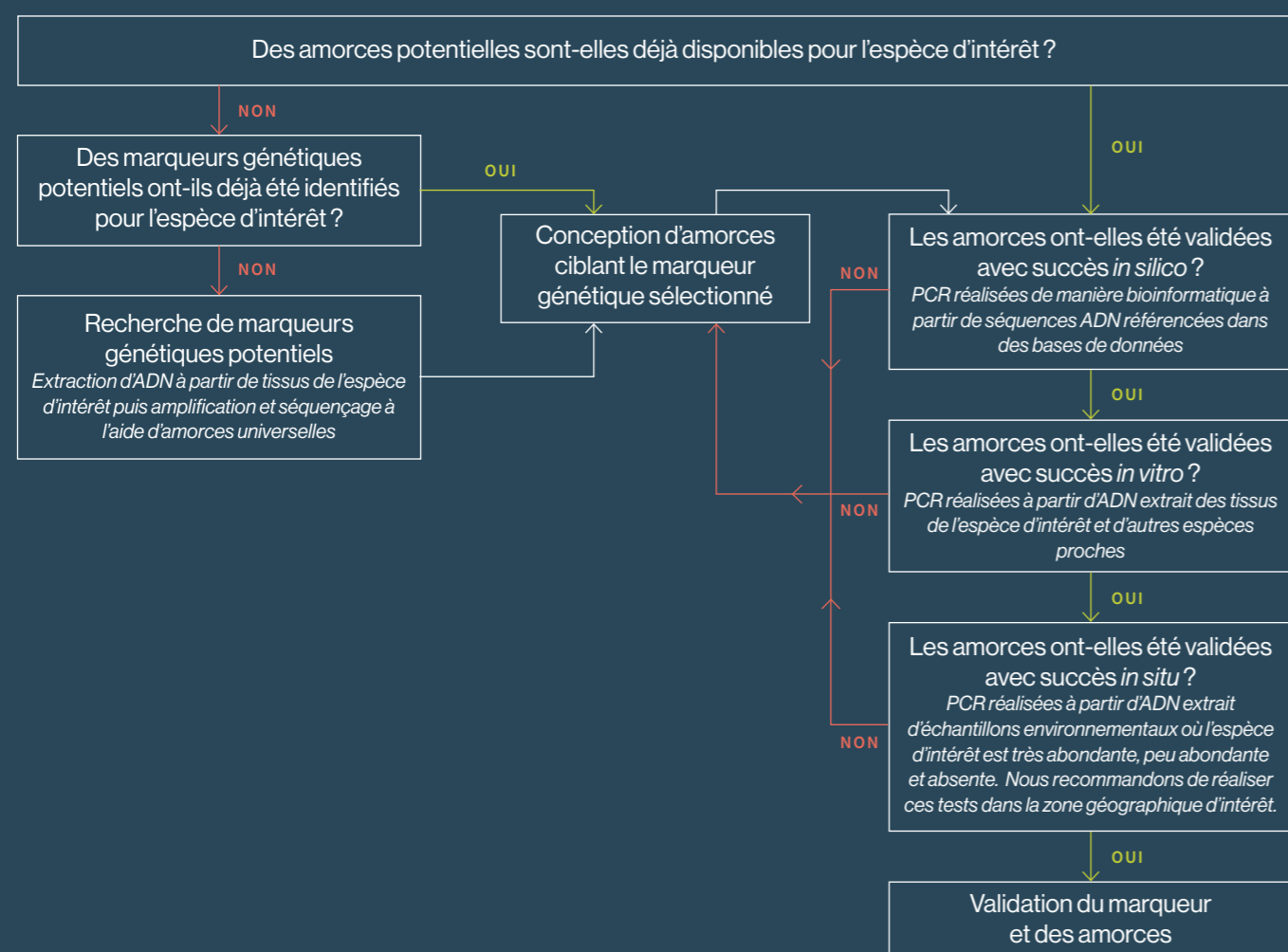
Lors d'une réaction PCR (PCR conventionnelle ou méthodes dérivées), un sous-échantillon de l'ADN total extrait est utilisé (de 1 à 10 % environ)³. Ainsi, même si l'ADN ciblé est présent dans l'extrait d'ADN obtenu, il peut ne pas être présent lors de la réaction PCR et ne pas être détecté. Pour pallier cette problématique et augmenter la probabilité de détection de l'ADN des espèces ciblées, plusieurs réactions PCR peuvent être réalisées pour un seul et même échantillon, on parle alors de répliques PCR. Il est généralement recommandé d'effectuer *a minima* trois répliques par échantillon. Cependant, ce chiffre doit être supérieur à six, lorsque la probabilité de détection des espèces est égale à 0,5²¹. En l'absence de cette information, un minimum de huit répliques devra être réalisé²¹. Selon les objectifs de l'utilisateur, et notamment dans le cas d'analyses de l'ADNe rare, il est conseillé d'augmenter davantage le nombre de répliques pour favoriser la détectabilité des espèces mais aussi pour permettre d'évaluer la fréquence et l'occurrence de l'ADN de l'espèce ciblée à travers les répliques réalisées^{15,21,22}. Dans le cadre des projets Vigilife, nous préconisons la réalisation de 12 répliques PCR.

CHAPITRE 05

À retenir

Choix du marqueur et des amorces

Les amorces doivent cibler des sites d'hybridation spécifiques de l'espèce étudiée et permettre d'amplifier une région d'ADN hautement conservée mais également suffisamment variable pour garantir qu'aucun autre taxon ne soit détecté lors de l'analyse. Ce point est important pour assurer la spécificité des amorces et ainsi limiter les risques de faux-négatifs ou de faux-positifs pouvant avoir des conséquences non négligeables dans le cas d'inventaires et de suivis de la biodiversité (Cf. chapitre 2). Ainsi, nous recommandons que les amorces utilisées aient été préalablement validées selon un protocole en trois étapes – *in silico*, *in vitro*, *in situ*^{23,24}. Outre un marqueur génétique précis, les amorces doivent également cibler une séquence courte d'ADN (moins de 150 paires de bases ou pb) pour permettre son amplification à partir d'ADNe potentiellement dégradé (Cf. chapitre 2)²⁵. La conception d'un couple optimal d'amorces peut donc être chronophage et coûteuse. Nous mettons également en garde l'utilisateur que la publication d'un couple d'amorces dans la littérature scientifique n'est malheureusement pas forcément gage de qualité et certaines amorces sont susceptibles d'amplifier d'autres espèces que celle ciblée. Nous recommandons donc de travailler avec un expert technologique de confiance.



Approche multispécifique ou metabarcoding de l'ADNe

L'approche multispécifique permet l'identification simultanée et sans *a priori* de plusieurs espèces distinctes appartenant à un même groupe taxonomique (du règne – bactéries, eucaryotes, etc. – à des niveaux taxonomiques intermédiaires – poissons, crustacés, etc.)¹⁵. Pour cela l'ADN extrait est d'abord amplifié par PCR conventionnelle en utilisant des amorces universelles. Les fragments d'ADN amplifiés (aussi appelés amplicons) sont ensuite séquencés et les résultats de séquençage sont analysés par méthodes bioinformatiques. Un tableau final recensant les espèces mises en évidence et le nombre de fois où les séquences associées ont été détectées par échantillon est alors obtenu et peut être analysé par l'expert écologue.

Vocabulaire

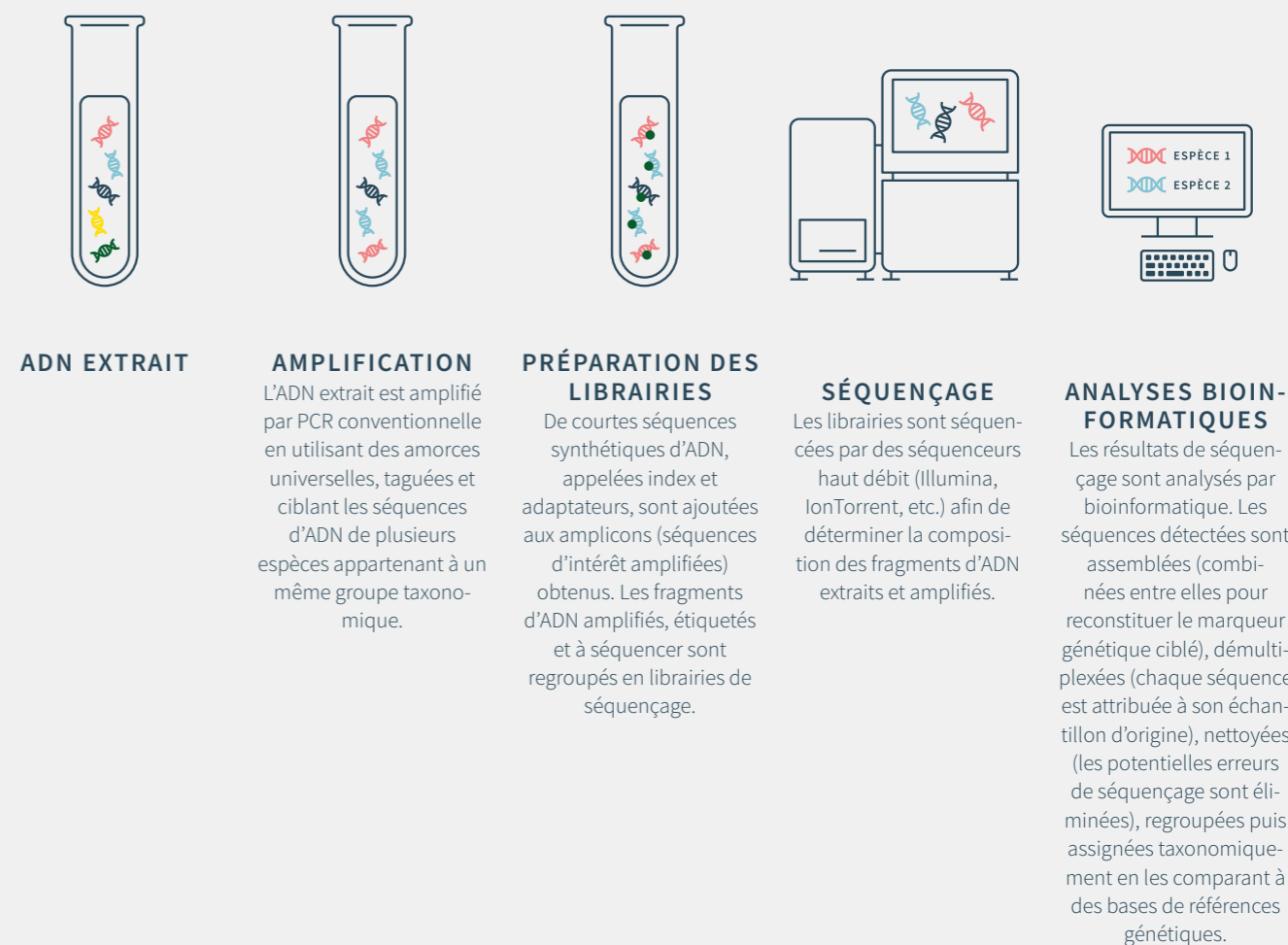
***Tag :** Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque échantillon ou chaque réplique PCR²⁶.

Adaptateur de séquençage : Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées pour permettre leur fixation sur le support du séquenceur¹⁵.

Index : Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque librairie de séquençage¹⁵.

Librairie de séquençage : Ensemble des amplicons (séquences d'intérêt amplifiées) à séquencer et comportant à leurs extrémités des tags, des adaptateurs de séquençage et des index²⁶.

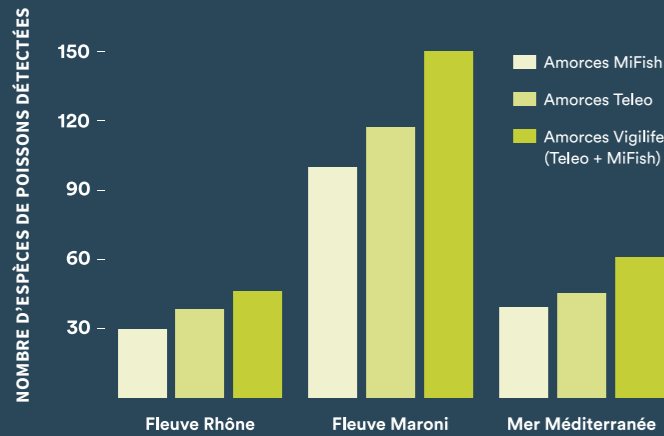
Approche multispécifique METABARCODING DE L'ADNE



CHAPITRE 05

À retenir

Choix des amorces et du marqueur



Comme lors d'une approche spécifique, les amorces utilisées dans le cadre du metabarcoding de l'ADNe doivent cibler un marqueur génétique court (de 200 à 500 pb pour les microorganismes et moins de 120 pb pour les macroorganismes³) et avoir été préalablement validées *in silico*, *in vitro* et *in situ*^{23,24}. De plus, la région d'ADN ciblée doit être suffisamment variable d'une espèce à l'autre afin d'obtenir une résolution taxonomique optimale. Inversement, les sites d'hybridation des amorces doivent être conservés et ubiquitaires au sein du groupe taxonomique d'intérêt pour permettre une amplification fiable et équivalente de l'ensemble des espèces. Le choix des amorces a un effet déterminant sur les espèces détectées. Ainsi, à partir d'un même extrait d'ADN, le nombre d'espèces identifiées peut être très variable en fonction des amorces sélectionnées.



Pour en savoir plus : Polanco et al. 2021. Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.232>

Nombre de cycles et de répliques PCR

Les problématiques de l'analyse spécifique et du metabarcoding de l'ADNe sont identiques, se référer au paragraphe portant sur la détection d'une espèce cible pour de plus amples informations.

Méthode de préparation des bibliothèques

Il existe trois méthodes de préparation des bibliothèques de séquençage : la PCR en une étape, la PCR en deux étapes et la ligation²⁵. Lors de la PCR en une étape, les tags, les index et les adaptateurs sont ajoutés directement aux amorces lors de leur synthèse. Cette méthode permet de gagner du temps lors de la préparation des échantillons pour le séquençage mais, les amorces étant très longues (du fait de l'ajout d'autres séquences), elle est également plus onéreuse. La longueur des amorces peut aussi affecter l'efficacité de la réaction d'amplification et ainsi réduire la probabilité de détection de l'ADN rare¹⁵. Lors d'une PCR en deux étapes, la première réaction PCR d'amplification est réalisée en utilisant les amorces taguées ciblant le marqueur génétique d'intérêt et contenant des sites d'hybridation pour les séquences supplémentaires. Une seconde PCR est ensuite effectuée pour ajouter les index et les adaptateurs. Bien que cette méthode permette de résoudre partiellement les problématiques liées à la longueur des amorces, elle est néanmoins plus facilement sujette aux contaminations croisées¹⁵. À l'heure actuelle, elle reste l'une des méthodes les plus utilisées car elle est plus économique et facile à mettre en œuvre. Cependant, nous recommandons d'utiliser la ligation qui consiste à ajouter les séquences supplémentaires à la suite de la réaction d'amplification par PCR en utilisant des enzymes appelées ligases. Cette méthode est la seule à conserver la taille initiale des amorces, permettant ainsi l'efficacité maximale de la réaction d'amplification tout en limitant les risques de contamination.

À retenir

Séquençage – technologie et profondeur

Il existe différentes technologies de séquençage qui se distinguent par leur performance (temps d'analyse), leur capacité (nombre de séquences pouvant être lues) et leur taux d'erreur. A l'heure actuelle, en raison de son rapport qualité/prix et de son taux d'erreur relativement faible, la technologie Illumina[®] est la plus utilisée²⁷. Au-delà du choix du séquenceur, la profondeur de séquençage est un point essentiel à prendre en compte. Cette notion fait référence au nombre total de séquences lues (les lectures de séquence sont aussi appelées reads) attendues par échantillon. Elle est dépendante des capacités du séquenceur et du nombre total d'échantillons séquencés. En général, les études portant sur l'analyse de l'ADNe visent une profondeur de séquençage comprise entre 50 000 et 200 000 séquences par échantillon. Cependant, lors d'études où la détection d'espèces rares représente un enjeu important, il est conseillé d'augmenter cette profondeur¹⁵.

Analyses bioinformatiques et bases de référence génétique

À l'heure actuelle, il existe de nombreux outils bioinformatiques destinés à l'analyse des données de séquençage. Cependant, chaque méthode est susceptible de donner des résultats différents voire incohérents d'un point de vue écologique si elle n'est pas choisie et utilisée correctement. Une analyse bioinformatique doit donc être optimisée selon le marqueur génétique ciblé, le groupe taxonomique d'intérêt et le séquenceur choisi. Indépendamment de la méthode utilisée, les séquences finalement obtenues sont comparées à des banques de séquences d'ADN d'organismes connus appelées bases de références génétiques. Afin de pouvoir identifier une espèce à partir de ses traces d'ADN, il est donc nécessaire que sa séquence d'ADN pour le marqueur utilisé ait été préalablement répertoriée. Il existe plusieurs bases de données publiques telles que celles du NCBI (National Center for Biotechnology Information), de la DDBJ (DNA Data Bank of Japan) et de l'ENA (European Nucleotide Archive) qui, bien qu'elles soient très utilisées et étendues, comportent des erreurs pouvant affecter la qualité de l'assignation taxonomique. Pour pallier cela et garantir une assignation plus qualitative, il est possible de construire une base de références génétiques en séquençant des tissus d'espèces connues (par exemple, prélevées sur le terrain, issues de collection ou de débarquements de pêche professionnelle). Nous recommandons de construire une base de références spécifique basée sur les organismes de la zone géographique d'intérêt en s'appuyant sur l'expertise des taxonomistes et de mettre à jour régulièrement ces données afin de suivre les évolutions taxonomiques.

Pour aller plus loin

Analyses bioinformatiques et regroupement de séquences

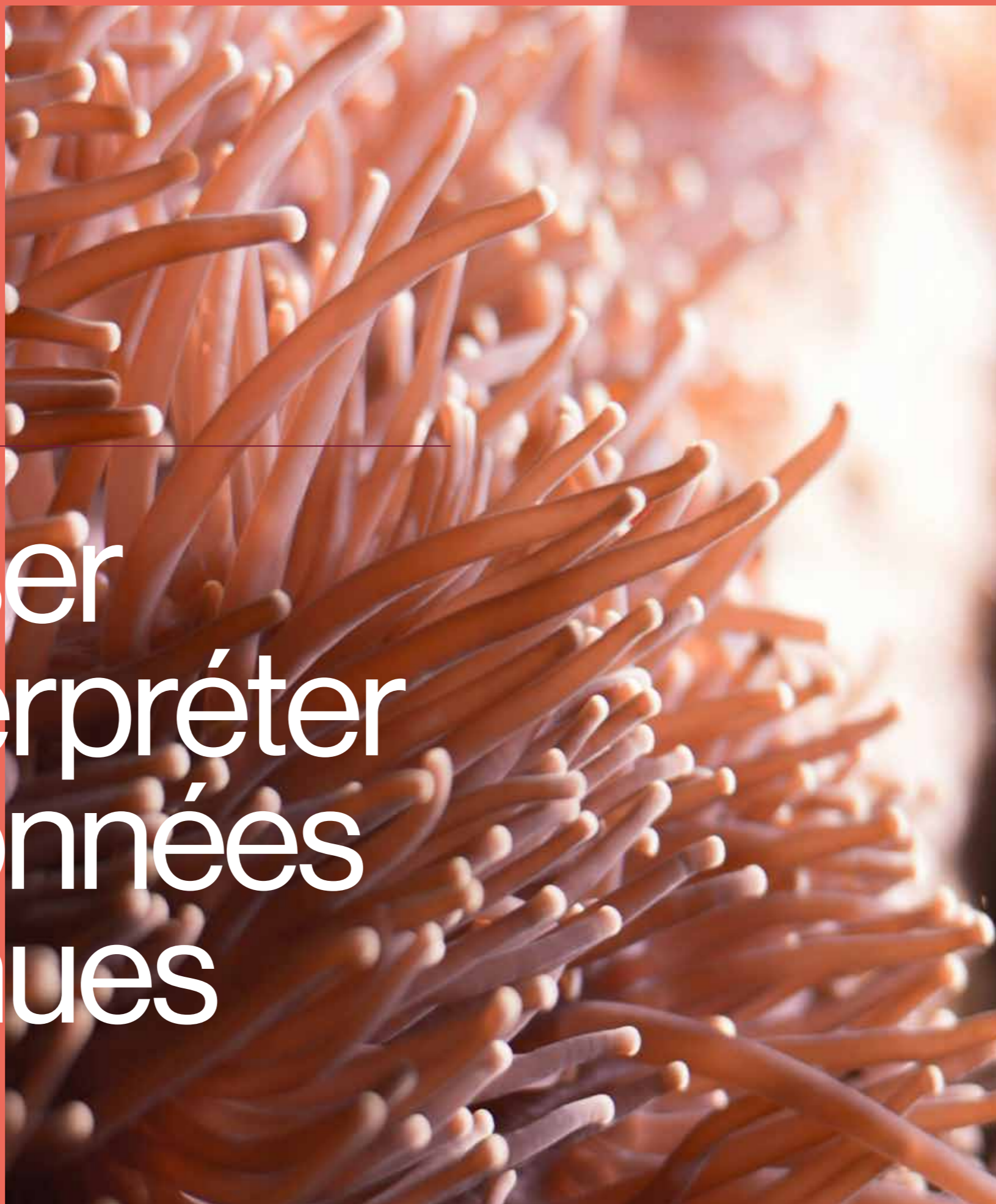
L'étape de regroupement des séquences, réalisées lors des analyses bioinformatiques, peut conduire à la formation d'OTUs (ou MOTUs, pour Molecular Operational Taxonomic Units ou unités taxonomiques opérationnelles moléculaires) ou d'ASVs (pour Amplicon Sequence Variants ou variants de séquence d'amplicon). Un OTU est un regroupement de séquences identiques entre elles jusqu'à un certain seuil. En d'autres termes, un OTU comprend x séquences identiques entre elles à y %. Un ASV consiste en une séquence principale et en plusieurs autres séquences proches, moins abondantes et considérées comme des erreurs de cette séquence principale. La construction d'un ASV nécessite donc une étape préliminaire de modélisation et d'identification des erreurs de séquençage²⁸.



PARTIE 03

03

Diffuser et interpréter les données obtenues





CHAPITRE 06

Le cycle de la donnée ADN⁰⁶

Les études fondées sur l'analyse de l'ADNe montrent une hétérogénéité des pratiques dans la gestion et la mise à disposition des données et des bases de références. En parallèle, les principes FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable) constituent des guides pour que les données scientifiques deviennent facilement trouvables, accessibles, interopérables avec les outils et les systèmes d'information et réutilisables. Il est donc nécessaire de consigner et de conserver certaines informations au cours du cycle de la donnée.

Définitions

→ DONNÉES ISSUES D'ADNE

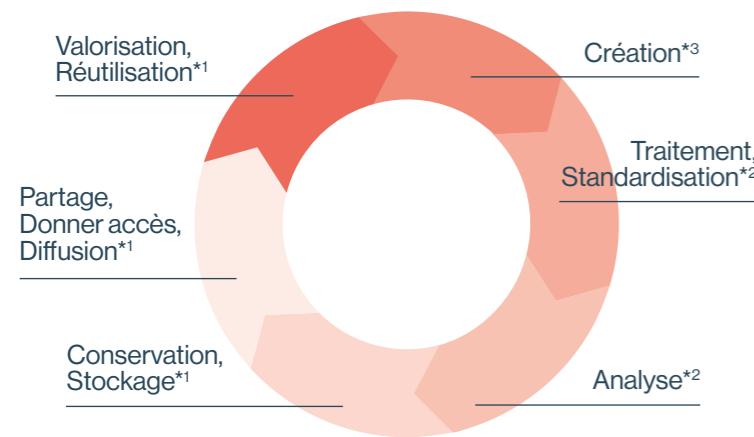
Une donnée d'occurrence d'espèce se compose toujours a minima d'un nom d'espèce, d'un nom d'observateur, d'un lieu et d'une date d'observation.



Dans le cas d'une donnée issue d'ADNe, l'observateur est la personne qui prélève l'échantillon d'ADNe tandis que le lieu et la date correspondent au lieu et à la date du prélèvement et non d'une observation directe d'espèce. Il est donc nécessaire de bien indiquer que la donnée est issue d'ADNe et de préciser un certain nombre d'informations supplémentaires. Une "donnée élémentaire d'échange" issue d'ADNe se constitue d'un ensemble d'informations minimales indispensables à associer pour considérer que la donnée est de qualité suffisante, c'est-à-dire en respectant au maximum les principes FAIR. Il s'agit donc, d'une part, de définir les informations obligatoires et facultatives à transmettre et, d'autre part, à quel niveau les transmettre (au niveau de la donnée ou de la métadonnée).

→ NOTION DE MÉTADONNÉES

Les métadonnées sont des informations relatives au jeu de données (qui est défini comme un regroupement homogène de données ayant des caractéristiques communes et issues d'un même protocole d'acquisition). Elles renseignent notamment sur le processus de collecte, sur les acteurs impliqués (exemple : producteurs et fournisseurs) et sur les modalités de diffusion. Les métadonnées ont pour objectifs de faire le lien avec les autres fichiers, de valoriser les acteurs ayant contribué à l'acquisition des données et de permettre la réutilisation des données dans des méta-analyses.



*1 Des données physiques et numériques obtenues
*2 Des données numériques obtenues
*3 Collecte et analyse laboratoire des échantillons

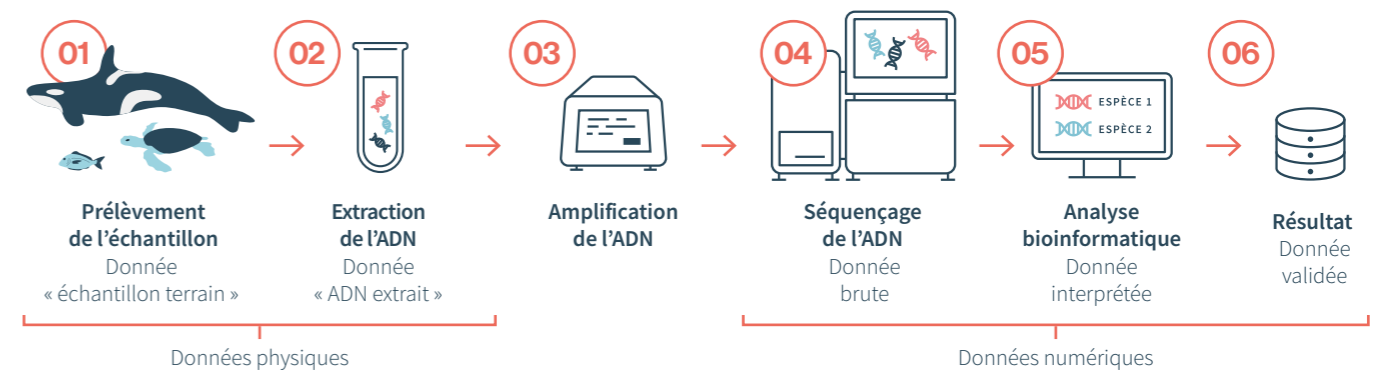
Type de données issues d'ADNe

Une donnée issue d'ADNe peut se définir par plusieurs types de données en fonction des différentes étapes d'échantillonnage et d'analyse.

POUR UNE APPROCHE SPÉCIFIQUE :



POUR UNE APPROCHE MULTISPÉCIFIQUE :



À chaque type de donnée peuvent être rattachées plusieurs informations relatives aux différentes étapes nécessaires pour passer d'un prélèvement sur le terrain à l'obtention éventuelle d'un nom d'espèce. Pour le moment, des discussions sont en cours sur le type d'information à collecter. Nous proposons ici une liste non exhaustive pour alimenter ces pistes de réflexion quant aux données issues d'ADNe.

Pour aller plus loin ↗



<https://inpn.mnhn.fr/programme/donnees-observations-especes/references/qualite>



<https://inpn.mnhn.fr/programme/donnees-observations-especes/references/metadata>



<https://www.pndb.fr/fr/ressources/principes-fair-et-cycle-de-vie-des-donnees>



<https://www.ouvrirlascience.fr/fair-principles/>

Certains principes concernant la qualité des données d'observation et des métadonnées sont rappelés sur le site internet de l'INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel). Des informations supplémentaires concernant les principes FAIR sont disponibles sur les sites internet du PNDP (Pôle National de Données de Biodiversité) et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.



CHAPITRE 06

→ PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON SUR LE TERRAIN

MÉTADONNÉES

- Informations sur le projet (nom, objectifs, description, identifiant, groupes taxonomiques visés, commanditaire, financeur, porteur de projet, partenaires, lien vers les publications et différents types de données associées, etc.)
- Identifiant et lieu de stockage du ou des échantillon(s)

CAMPAGNE DE PRÉLÈVEMENT :

- Nombre de sites échantillonnés

SITE ÉCHANTILLONNÉ :

- Identifiant unique pour chaque échantillon
- Matrice de prélèvement (eau)
- Stratégie d'échantillonnage (échantillon indépendant ou pool d'échantillons, transect, point fixe, etc.)
- Volume par échantillon
- Date / heure du prélèvement de l'échantillon
- Point gps, profondeur
- Typologie des milieux (herbiers, zone coralligène, etc.)
- Matériel de collecte (kit / nom du laboratoire)

Option : condition météo (champ fermé) dont Température

→ EXTRACTION D'ADN

- Conditions de conservation des échantillons avant et après extraction de l'ADN
- Réalisée sur le terrain ou au laboratoire
- Laboratoire qui fait l'extraction
- Protocole d'extraction
- Quantité d'ADN extraite
- Contrôles négatif / positif
- Identifiant et localisation de l'extrait d'ADN s'il est conservé

→ PHASE D'AMPLIFICATION DE L'ADN

- Réalisée sur le terrain ou au laboratoire
- Laboratoire qui fait la PCR
- Approche spécifique (PCR, qPCR ou dPCR) ou multispécifique
- Nombre de cycles PCR
- Nombre de répliques PCR
- Répliques rassemblés ou individualisés pour le séquençage (système de tagging)
- Température d'hybridation/cycle PCR
- Machine thermocycleur
- Marqueur (+ région)
- Primers et base de références utilisée : global/local + version de la base
- Dilution/quantité ADN
- Contrôles négatif/positif
- Si utilisation d'amorces de blocage
- Si qPCR: type de sonde utilisé (Taqman ou autre?)

→ SÉQUENÇAGE

- Réalisé sur le terrain ou au laboratoire
- Identifiant laboratoire/compagnie
- Protocole de préparation des librairies (PCR en 1 étape, PCR en 2 étapes ou ligation)
- Nom et modèle du séquenceur (+ pour Illumina: type de technologie de séquençage: paired-end ou single-read)
- Profondeur de séquençage

→ BIOINFORMATIQUE

- Outil : script + software/package + version + laboratoire qui fait la bioinformatique (+ optionnel : nom de la personne qui réalise la bioinformatique) + Séquences ASV/OTU
- Base de références : nom, version et date de consultation
- % de similarité de regroupement de séquences et/ou d'assignation taxonomique
- Nom du validateur/ expert qui valide si l'espèce assignée est possible
- Nom du taxon validé
- Quantité de données perdues pendant le nettoyage des données, si possible à chaque étape de la procédure bioinformatique.
- Liste des contaminations identifiées

Option: Nom du taxon assigné avant validation

Conserver, diffuser et utiliser les données

→ PROPRIÉTÉ DES DONNÉES

La propriété des données est à définir au moment de la conception de l'étude. Il s'agit de définir à qui appartiennent les données - voire chaque type de données - et notamment d'indiquer lors de la transmission d'une donnée le rôle de chaque personne intervenue pour l'acquisition de cette donnée : financeurs, donneurs d'ordre, opérateurs de terrain et de laboratoire, etc. Lorsque le commanditaire est une infrastructure publique, la propriété des données répond à un certains nombres d'obligations légales de mise à disposition.

→ LIEU ET TEMPS DE STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS BRUTS, DES EXTRAITS D'ADN ET DES DONNÉES DE SÉQUENÇAGE

Pour les données physiques, des congélateurs peuvent être nécessaires pour éviter la dégradation de l'ADN. Pour les données numériques, des capacités de stockage importantes sont nécessaires, notamment pour conserver les données brutes (sorties de séquenceur). Dans le cadre d'une publication scientifique, les revues demandent aux auteurs que les données brutes soient accessibles via des liens pérennes, notamment afin de pouvoir refaire ultérieurement les analyses (par exemple, avec de nouvelles bases de références génétiques). Des serveurs en ligne proposent leur service avec des liens pour télécharger les fichiers. Les données brutes peuvent être conservées dans les entrepôts de données et les métadonnées dans les catalogues comme le Pôle National de Données de Biodiversité (PNDB). Même si les données ne sont pas ou plus disponibles (par exemple, dans le cas d'un embargo), il est important que les métadonnées restent accessibles.

→ COMMENT DIFFUSER ET METTRE À DISPOSITION LES DONNÉES ?

Les données physiques peuvent être conservées par le propriétaire ou le laboratoire qui a fait l'extraction d'ADN, en fonction de ce qui est convenu dans le cahier des charges de la prestation ou du partenariat. Certains échantillons d'intérêt pourraient être conservés dans des musées comme un témoin du milieu à un instant donné, ce qui demande une logistique et une organisation qui restent à mettre en place.

Parmi les données numériques, les données brutes (sorties de séquenceur) et les données analysées (sorties de la phase de bioinformatique) peuvent être déposées dans des bases de données nationales ou internationales (ENA, NCBI, GBIF - Global Biodiversity Information Facility, INPN - Inventaire National du Patrimoine Naturel, etc.). Il est également possible de déposer les données sur une plateforme (type plateforme privée par exemple) mais, par manque de référencement, leur utilisation rend plus difficile l'accès aux données. Pour faciliter leur visibilité, les données peuvent être valorisées dans le cadre de publications scientifiques (exemple : data paper) et mises à disposition dans les systèmes d'information nationaux et internationaux (exemple : GBIF).

Les données validées peuvent être diffusées par les voies « classiques » via les systèmes d'informations sous réserve de bien renseigner qu'elles sont issues d'ADNe et de renseigner un maximum d'informations dans les métadonnées associées. Des réflexions et travaux sont en cours pour améliorer et faciliter la gestion des données issues d'ADNe obtenues dans le cadre de la recherche et des politiques publiques. Des standards et outils dédiés devront peut-être être définis pour garantir une qualité des données et respecter les principes FAIR. Comme pour les données d'espèces obtenues par méthodes traditionnelles, lorsqu'une donnée validée issue d'ADNe est transmise, un identifiant unique et persistant (DOI - Digital Object Identifier, UUID - Universally Unique Identifier, etc.) doit permettre de faire le lien avec les autres types de données qui ont permis de l'obtenir.

Pour aller plus loin ↗

Mise à disposition des données



<https://inpn.mnhn.fr/accueil/index/>



<https://doi.org/10.35035/doc-vf1a-nr22>

Pour le territoire français, la mise à disposition de données issues d'ADNe peut se faire via les plateformes régionales ou via les différents entrepôts de données. Des recommandations sont disponibles sur le site internet de l'INPN.

Pour les données hors territoire français, un guide explicatif du GBIF est disponible.



© Greg Lecoeur, WE ARE MEDITERRANEE



Pour aller plus loin ➤

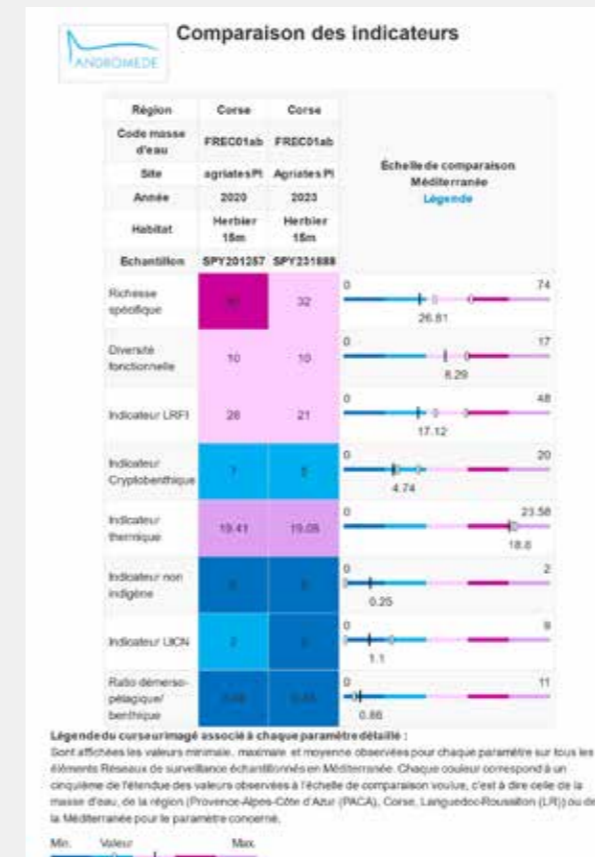


La biodiversité mondiale en Open Data

La plateforme cartographique Vigilife Maps, fruit d'une concertation entre acteurs de la recherche, de la conservation et du monde économique, sera prochainement dévoilée. Grâce à cette plateforme, les données issues d'ADNe seront facilement et gratuitement consultables, via une carte interactive, par les gestionnaires de l'environnement, les chercheurs, les décideurs politiques, etc. Il sera ainsi possible de connaître les occurrences d'une espèce, d'être informé de l'apparition d'une espèce invasive, ou d'étudier l'évolution de la biodiversité sur un même site au cours du temps, que nous appelons « sentinelle », grâce notamment à des indicateurs synthétiques validés scientifiquement. Ces données standardisées et issues d'ADNe alimenteront également les banques de données nationales et internationales sur la biodiversité. Le grand public pourra quant à lui s'informer et prendre conscience de l'état de santé des écosystèmes qui l'entourent, tout en mesurant l'impact des actions de conservation ou de restauration, via par exemple les aires protégées, mises en place par les partenaires de Vigilife. Les données seront présentées sur la plateforme Vigilife Maps à fine résolution spatiale, de l'ordre du kilomètre, en respectant les règles de diffusion définies avec chaque donneur d'ordre ou partenaire concerné, en dégradant l'information pour les espèces commerciales ou classées sur liste rouge de l'UICN afin de garantir l'anonymat de leurs derniers habitats, et en accord avec les politiques nationales liées à l'accès aux ressources génétiques.

“ La plateforme cartographique Vigilife Maps sera prochainement dévoilée. ”

Pour aller plus loin ➤



Créée en 2013 par l'entreprise Andromède Océanologie et avec l'appui de l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, MEDTRIX est une plateforme cartographique en ligne pour la surveillance des eaux côtières et des écosystèmes de Méditerranée. Gérée par l'association l'Oeil d'Andromède, elle facilite l'accès et la consultation à des données de surveillance spatialisées de très bonne résolution (entre 0 et 130 mètres de fond, cartographies au 1/10000ème) tout le long des côtes méditerranéennes françaises et pour quelques zones en Atlantique, Italie, Tunisie, Espagne, et Maroc. Les données proviennent d'une cinquantaine de structures publiques et privées et sont mises gratuitement à disposition des utilisateurs (3750 inscrits à ce jour) à travers une quarantaine de projets regroupés en huit catégories (réseaux de surveillance, état des eaux côtières et de transition, restauration écologique, gestion côtière, cartographie des habitats, observatoires et sites ateliers, expéditions, sciences participatives). Une fois son profil créé, l'utilisateur accède gratuitement à tous les projets et aux nombreuses fonctionnalités de la plateforme : édition de cartes, visualisation et téléchargement des fiches de suivi / des publications scientifiques / des rapports d'étude, réalisation de graphiques, affichage de données statistiques, comparaison de stations, utilisation du flux WMS, etc. Il a également la possibilité de construire sa propre carte à partir des données disponibles sur Medtrix.

Le projet PISCIS, par exemple, présente les résultats du réseau de suivi des assemblages ichthyologiques opéré depuis 2019 à partir d'ADNe par Andromède Océanologie avec le soutien de l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse. La caractérisation des assemblages ichthyologiques est réalisée sur 165 stations par campagne régionale annuelle sur la période mi-mai/fin juin, sur l'ensemble de la façade méditerranéenne française bordée par les trois régions : Corse, Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) et Occitanie.

Un outil de comparaison des stations (voir tableau ci-contre) existe dans ce projet. Il permet de comparer les différentes métriques calculées et ce à différentes échelles temporelles et spatiales de comparaison (Méditerranée, Région, masse d'eau côtière).

Medtrix, c'est aussi une communauté animée par un cahier de la surveillance envoyé trois à quatre fois par an et un colloque tous les deux ans.



Pour en savoir plus : <https://plateforme.medtrix.fr/>



https://medtrix.fr/portfolio_page/piscis/



CHAPITRE 07

Quelques exemples d'applications et d'interprétations ⁰⁷

Bien que les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe offrent une puissance analytique accrue, il est nécessaire d'interpréter les résultats obtenus sur le plan écologique. Il s'agit d'une étape essentielle pour assurer l'exactitude, la fiabilité et la signification biologique des conclusions tirées à partir des analyses. Alors que les progrès technologiques ont considérablement amélioré la quantité et la qualité des données disponibles, il est impératif de s'assurer que ces données sont interprétées avec précision et dans un contexte pertinent sur le plan biologique et écologique. A travers quelques retours d'expérience, ce chapitre vise à donner des exemples d'interprétation réalisée à partir de données issues de l'ADNe.

Il est nécessaire de garantir la validité écologique des résultats obtenus.



© Greg Lecoeur, WE ARE MEDITERRANEE

Paroles d'expert ↙

L'ADNe pour développer des indicateurs de biodiversité



Alicia Dalongeville, Ingénieure de recherche, MARBEC



Pour en savoir plus : Dalongeville A et al. 2022. Benchmarking eleven biodiversity indicators based on environmental DNA surveys: more diverse functional traits and evolutionary lineages inside marine reserves. *Journal of Applied Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14276>



La dégradation des habitats côtiers, la surexploitation des ressources et le changement climatique provoquent une érosion rapide de la biodiversité marine partout dans le monde, et particulièrement en Méditerranée où les activités humaines sont omniprésentes. Les Aires Marines Protégées (AMP), espaces délimités où les activités humaines sont réglementées, visent à enrayer cette érosion. Les zones de protection forte, où toutes extractions et activités de pêche sont interdites, sont particulièrement efficaces pour protéger la biomasse (quantité totale) des poissons. Leurs effets sur les rôles écologiques des espèces et sur les interactions trophiques au sein de l'écosystème sont cependant moins évidents. Pour répondre à cette problématique, nous avons analysé 99 échantillons d'ADNe prélevés à l'intérieur et à l'extérieur de 9 AMP de Méditerranée française en zone de protection forte (habitats et profondeurs similaires). Grâce au séquençage de l'ADN contenu dans ces échantillons, nous avons établi la liste des espèces de poissons présentes sur chacun des sites et à partir desquelles nous avons calculé 11 indicateurs de biodiversité pouvant être comparés à l'intérieur et à l'extérieur des zones protégées.

Nos analyses ont montré que la richesse spécifique (nombre total d'espèces) était plus élevée à l'extérieur des AMP. Ce résultat plutôt contre-intuitif s'explique par une augmentation du ratio entre les espèces pélagiques/démersales (qui vivent dans la colonne d'eau) et benthiques (qui vivent sur le fond) à l'intérieur des zones protégées. En effet, plus d'espèces démersales et pélagiques, habituellement ciblées par les pêches, se trouvent dans les AMP alors que les espèces crypto-benthiques, avec un cycle de vie court et résilientes aux perturbations, abondent dans les zones de pêches. Notre étude a également montré que la diversité fonctionnelle (caractéristiques écologiques telles que taille, système de reproduction, régime alimentaire etc.) et la diversité phylogénétique (relations de parenté entre les espèces pouvant refléter des traits non-mesurés mais conservés dans l'histoire évolutive des espèces) sont plus élevées à l'intérieur des AMP. Les communautés de poissons en zones de protection forte sont donc plus diversifiées dans leur fonctions écologiques et lignées génétiques, ce qui est important pour l'équilibre, le fonctionnement et la résilience des écosystèmes. Inversement, en zones de pêche, elles sont constituées d'espèces proches et présentent des caractéristiques écologiques similaires.

Les indicateurs ADNe développés dans cette étude peuvent être utilisés comme outils de suivis de la biodiversité pour mettre en évidence une détérioration ou un rétablissement de l'écosystème. L'ADNe offre donc un outil puissant pour diagnostiquer l'état de santé de la biodiversité marine et suivre son évolution de façon standardisée et répliquable sur le long-terme.

	INDICATEURS	EFFET DES AMPs
BIODIVERSITÉ	Richesse spécifique	-
	Diversité fonctionnelle	↗
	Diversité phylogénétique	↗
ÉCOLOGIE	Ratio espèces pélagiques et démersales / espèces benthiques	↗



CHAPITRE 07

Paroles d'expert ↙

L'ADNe pour étudier les communautés benthiques



Stefano Varrella
Département Sciences de la vie et de l'environnement,
Université polytechnique des Marches (Italie)



Roberto Danovaro
Département Sciences de la vie et de l'environnement,
Université polytechnique des Marches (Italie)



Cinzia Corinaldesi
Département Sciences de la vie et de l'environnement,
Université polytechnique des Marches (Italie)

Les pressions anthropiques menacent de plus en plus la biodiversité marine et le fonctionnement des écosystèmes. Il est donc urgent de développer des outils pour un recensement précis et rapide de la biodiversité marine, afin de détecter précocement des changements survenant dans les écosystèmes marins. L'ADN environnemental (ADNe) est mis en œuvre comme outil moléculaire pour étudier les écosystèmes et représente une approche innovante pour étudier la biodiversité à travers un large spectre de taxons (des procaryotes aux grands métazoaires). Cette approche peut être appliquée à différentes échelles spatiales et temporelles, permettant d'apporter de nouvelles connaissances, et peut être appliquée à une variété de compartiments, y compris l'eau de mer et les sédiments. L'analyse de l'ADNe a considérablement stimulé les recherches sur la biodiversité : i) en fournissant une analyse rapide de la biodiversité pouvant être comparée/associée à des identifications taxonomiques classiques ; ii) en utilisant des approches d'échantillonnage non destructrices et non invasives ; iii) en identifiant les signatures génétiques des espèces rares, cryptiques et larvaires ; iv) en évaluant les changements de biodiversité en relation avec les changements environnementaux ; v) en garantissant la standardisation et la reproductibilité des résultats ; vi) en améliorant l'efficacité et la rentabilité des analyses de biodiversité.

L'ADNe peut être utilisé pour détecter des espèces individuelles par amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (par exemple, qPCR ou ddPCR) en utilisant des amorces spécifiques à l'espèce, tandis que plusieurs taxons peuvent être identifiés en une seule fois par metabarcoding de l'ADNe en utilisant différents marqueurs génétiques (par exemple, ARNr 16S, ARNr 18S, Cytochrome c Oxydase I), couplé à un séquençage haut débit de la région génétique amplifiée. Le principal défi souvent associé au metabarcoding est de savoir s'il peut être utilisé comme méthode unique dans les études de biodiversité.

Des recherches récentes menées par des chercheurs de l'Université Polytechnique des Marches (UNIVPM) ont abordé cette question en comparant des méthodes morphologiques et moléculaires dans le temps (à différentes saisons) et à grande échelle. Le metabarcoding de l'ADNe surpasse les analyses morphologiques en termes de nombre de taxons identifiés. Les approches taxonomiques traditionnelles sont toujours nécessaires pour le recensement des organismes de la macro- et de la méiofaune benthique, mais lorsque l'on se concentre sur les micro-eucaryotes, dont la taille varie entre 0,2 et 20 µm, la diversité alpha détectée avec les approches moléculaires peut être deux fois plus élevée car de nombreux micro-organismes sont difficiles à isoler et à identifier. En raison de plusieurs limitations (par exemple, incomplétude des bases de données génétiques et absence de procédures bioinformatiques normalisées), **le metabarcoding de l'ADNe reste une approche complémentaire de la taxonomie classique, mais elle est très prometteuse et pourrait permettre l'identification précoce d'espèces (par exemple, larves ou stades précoces de la vie) qui n'ont pas encore atteint une taille de population significative.**



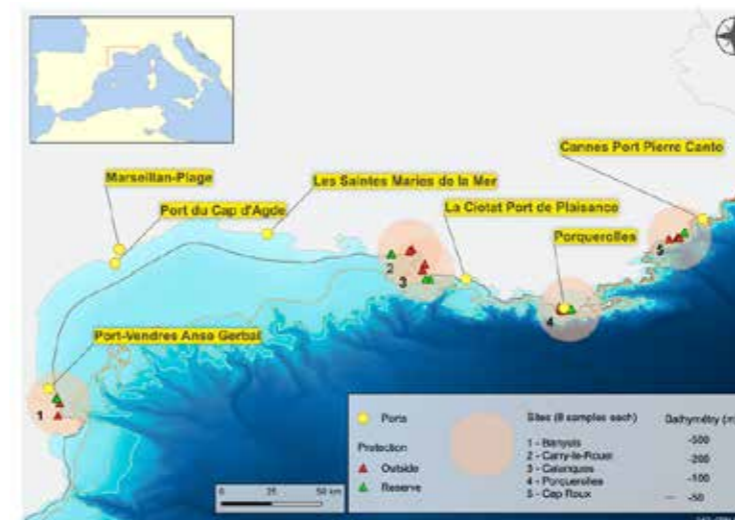
Au-dessus écosystème côtier, en haut à droite écosystème benthique, en bas à droite plancton © UNIVPM

Paroles d'expert ↙

L'ADNe pour étudier la biodiversité des ports



Stéphanie Manel,
Directrice d'études à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes
et directrice de l'équipe Biogéographie et Ecologie des
Vertébrés au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive



Au-dessus Port de Cannes
© David Mouillot
À droite Port Méditerranéen



Les zones marines côtières sont caractérisées par une grande diversité d'habitats qui sont des zones refuges pour de nombreuses espèces. Ces habitats sont également des nurseries essentielles pour l'installation et la croissance des juvéniles, particulièrement ceux des poissons commerciaux. Cette diversité en espèces et en habitats contribue pour 90% aux ressources marines exploitées. Mais cette diversité est menacée par l'artificialisation croissante des côtes avec 1/3 de la population humaine concentrée sur les côtes. Les ports en particulier, en remplaçant les habitats naturels, pourraient avoir un effet délétère sur la biodiversité, même s'ils fournissent des abris contre les conditions défavorables (vagues, tempêtes, températures) qui pourraient avoir un effet bénéfique sur certaines espèces à certains stades de vie. L'ingénierie écologique a également permis de recréer une partie de l'habitat, et des études ont montré l'efficacité de ces mesures pour les jeunes poissons. La biodiversité qu'abrite les ports et le rôle écologique des habitats artificiels sont des questions essentielles pour une bonne gestion de ces écosystèmes anthropisés.

À partir du séquençage de l'ADN contenu dans 28 échantillons d'ADN environnemental (ADNe) collectés dans 7 ports en Mer Méditerranée et de l'identification des espèces grâce aux séquences présentes dans des bases de références, nous avons détecté 122 espèces de poissons différentes présentes dans les ports avec en moyenne 65 espèces par port. Cette richesse en espèces augmente avec le substrat rocheux (ex : port de La Ciotat) par rapport au substrat sableux, et la surface du port (Cap d'Agde).

Nous avons ensuite comparé cette biodiversité dans les ports à celle présente dans 10 sites en dehors des ports (parmi lesquels 5 ont été prélevés dans des réserves marines avant et pendant le confinement strict du printemps 2020). Nous avons identifié 27 espèces uniques aux ports, en particulier des espèces de petites tailles et peu mobiles telles que les gobies et blennies. Le nombre d'espèces moyen par échantillon dans les ports est similaire à celui des milieux naturels côtiers en dehors des ports durant le confinement, et supérieur au nombre d'espèces des zones pêchées en dehors de la période de confinement. Par contre, la variation de la composition en espèces entre les ports est plus faible que celle entre les milieux naturels, suggérant une homogénéisation de la biodiversité dans les ports.

Cette biodiversité en poissons élevée dans les ports pourrait provenir de l'utilisation des habitats artificialisés par les jeunes recrues des espèces côtières. L'homogénéisation plus grande de la diversité entre les ports s'expliquerait par la redondance des habitats (substrat, faible profondeur, manque de structuration tridimensionnelle, fort trafic de bateaux etc.). Ces travaux sur la diversité dans les ports se poursuivent dans le cadre du projet BiodivMed, soutenu par l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, et des résultats complémentaires sur plus de sites permettront de compléter ces premiers résultats



Pour en savoir plus :
Manel et al. 2024. Benchmarking fish biodiversity of seaports with eDNA and nearby marine reserves. 2024. Conservation Letters.
<https://doi.org/10.1111/conl.13001>



CHAPITRE 07

Paroles d'expert ↙

L'ADNe pour étudier un hotspot de biodiversité



Jean-Baptiste Juhel, PhD, chercheur post-doc à l'université de Montpellier, consultant indépendant (Octopusdatalab.com)

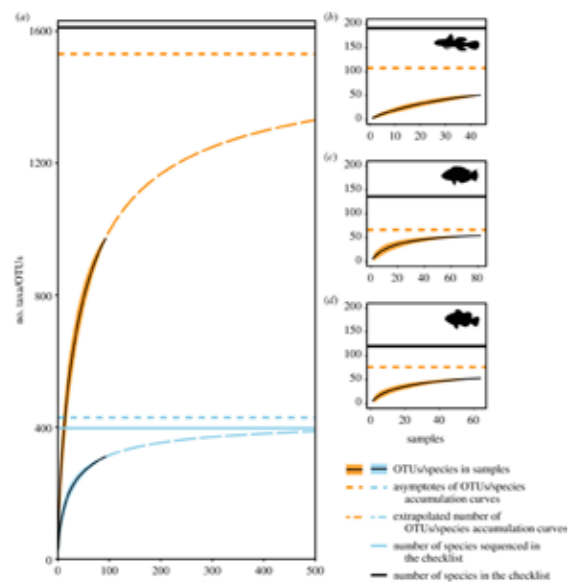


Figure 1. Courbes d'accumulation des espèces assignées (bleu) et des Operational Taxonomic Units (OTU, orange) obtenues dans l'ensemble de l'échantillonnage (a) et au sein des trois familles les plus diversifiées dans la zone: Gobiidae (b), Labridae (c) et Pomacentridae (d).

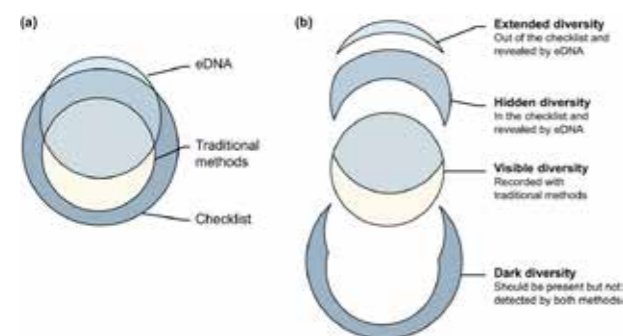


Figure 2. Diagrammes conceptuels illustrant la diversité des espèces visibles, cachées (hidden diversity), étendues (extended diversity) et obscures (dark diversity) dans le contexte d'une liste régionale d'espèces partiellement connues (a) et la description de chaque partie de la diversité spécifique (b).

Les inventaires d'espèces sont les données de base dans les domaines de l'écologie, de la biogéographie et de la conservation. Ces inventaires sont essentiels pour quantifier l'impact des activités humaines et évaluer les stratégies de conservation. Pourtant, les inventaires historiques sont souvent incomplets. En effet, certaines espèces ne sont pas détectées en raison d'un effort d'échantillonnage insuffisant, de limites techniques des comptages visuels (ex : profondeur en plongée) ou de traits fonctionnels particuliers (ex : comportement élusif, petite taille corporelle). Le metabarcoding de l'ADNe peut pallier ces biais car il peut détecter des espèces qui ne sont pas enregistrées par les méthodes traditionnelles. Cependant, l'application de cette méthode pour estimer la biodiversité et améliorer les inventaires traditionnels devait être évaluée et quantifiée.

L'expédition LENGGURU en Papouasie Occidentale (2017, www.ird.fr), au cœur du Triangle Corallien, a permis la collecte d'ADNe à l'endroit le plus riche en espèces marines de la planète. Ces données ont permis de revisiter les listes d'espèces de poissons dans la zone et la création de deux méthodes d'analyses importantes. La première est l'utilisation de courbes d'accumulation pour déterminer la détectabilité des différentes familles de poissons et l'effort d'échantillonnage nécessaire pour les détecter. Cette méthode est aujourd'hui très répandue et peut être facilement utilisée sur n'importe quel écosystème. La deuxième méthode d'analyse est une méthode basée sur la théorie de l'échantillonnage pour estimer la diversité cachée des espèces. Celle-ci consiste à prendre en compte l'occurrence des espèces rares dans deux méthodes différentes (ici, l'ADNe et les comptages en plongée) pour estimer la véritable diversité spécifique de la zone.

À travers ces deux études fondatrices, de nouvelles approches de modélisation ont permis de faire avancer l'utilisation de l'ADNe comme un outil d'inventaire faunistique novateur et efficace.



© IRD - Régis Hocdé, Lengguru 2014



Pour en savoir plus : Juhel et al. 2020. Accumulation curves of environmental DNA sequences predict coastal fish diversity in the coral triangle. *Proc. R. Soc. B.* <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0248>



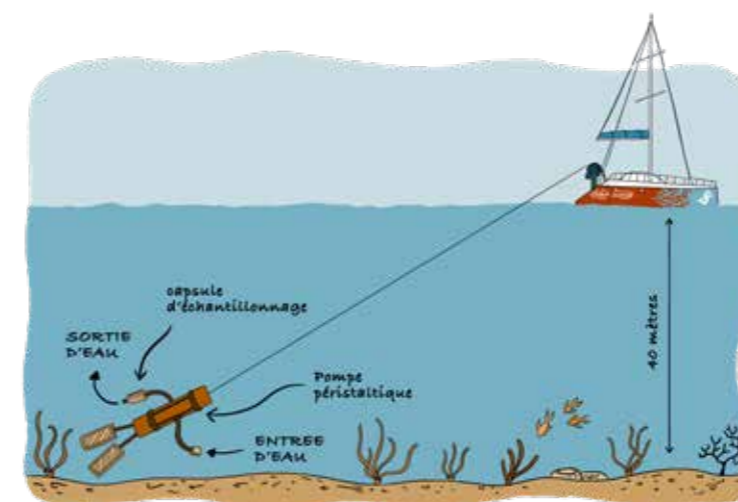
Juhel et al. 2022. Estimating the extended and hidden species diversity from environmental DNA in hyper-diverse regions. *Ecography.* <https://doi.org/10.1111/ecog.06299>

Paroles d'expert ↙

L'ADNe pour détecter des espèces rares



Nadia Faure, Doctorante CIFRE Beauval Nature et Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive



© Aline et Nadia Faure



Requin ange © Laurent Ballesta, Andromède Océanologie

L'étude des espèces rares en milieu marin constitue un défi complexe, amplifié par la vaste étendue océanique et l'accès difficile des profondeurs. L'émergence de techniques innovantes telles que la détection d'espèce cible par ADNe offre une solution prometteuse, permettant de détecter les espèces élu-sives grâce à leur ADN laissé dans l'environnement aquatique. Nous avons choisi d'utiliser l'ADNe pour repérer la présence d'un requin en danger critique d'extinction en Corse : l'ange de mer (*Squatina squatina*). Fréquemment observé sur les côtes Méditerranéennes et Atlantique Est jusqu'au début du 20^{ème} siècle, l'ange de mer est aujourd'hui devenu rare en raison d'une forte pression de pêche. Compte tenu du mode de vie benthique de cet élasmobranchie et de sa rareté, la méthode basée sur l'ADNe apparaît comme une alternative plus efficace que les méthodes traditionnelles (comptage en plongée, pose de caméras, chalutage) pour étudier sa distribution actuelle. La collection des échantillons d'ADNe a été effectuée le long de 156 transects, à l'aide d'une pompe péristaltique immergeable tractée derrière un catamaran, en longeant tout le littoral corse. Nous avons ensuite analysé ces échantillons en laboratoire à Montpellier par PCR quantitative (qPCR), en amplifiant uniquement l'ADN ciblé. Pour cela, nous avons développé une paire d'amorces spécialement conçue pour cibler l'ADN mitochondrial des trois espèces d'ange de mer méditerranéennes (*S. squatina*, *S. oculata*, *S. aculeata*), toutes menacées d'extinction. Même lorsqu'il est présent en faible quantité, l'ADN est repéré dans l'échantillon grâce à une augmentation de la fluorescence liée à l'amplification de l'ADN. Les produits de la qPCR ont ensuite été séquencés pour identifier l'espèce exacte parmi les trois anges de mer.

Ces analyses ont révélé la présence de *S. squatina* sur 9 sites en Corse, notamment au sein du Parc Naturel Marin du Cap Corse et de l'Agriate et à l'Ouest de l'île, où l'espèce n'a encore jamais été observée. En analysant ces mêmes échantillons par metabarcoding, seuls 4 sites ont été testés positifs à l'ADN de *S. squatina*, ce qui atteste de la meilleure sensibilité de la qPCR aux faibles concentrations d'ADNe. L'obtention des résultats en moins d'une semaine a permis aux biologistes de retourner plonger sur ces sites et d'observer deux individus qui ont pu être balisés pour étudier leur comportement.

L'utilisation de l'ADNe se révèle particulièrement efficace pour étudier la distribution d'une espèce rare ou difficile à observer dans son milieu. Cette approche offre une détection rapide de la présence de l'espèce ciblée, facilitant ainsi une mise en œuvre précoce de mesures de protection et la sensibilisation des acteurs.

Barroil et al. (2023). PIAF : Poissons des fonds meubles, inventaire par ADN environnemental. Rapport intermédiaire. Appel à projets « Renforcer la connaissance des habitats de fonds meubles en Méditerranée » cofinancé par l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, l'Office Français de la Biodiversité et l'Office de l'Environnement de la Corse. 42 pages.

Barroil et al. (2024). ANGE : Connaître et faire connaître le dernier refuge (Corse) de l'ange de mer commun (*Squatina squatina*) en France. Rapport final. Financé par l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, l'Office Français de la Biodiversité, le Parc Naturel Marin du Cap Corse et de l'Agriate et la Fondation Prince Albert 2. 187 pages.



Pour en savoir plus : Faure et al. (2023). An environmental DNA assay for the detection of Critically Endangered angel sharks (*Squatina* spp.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* <https://doi.org/10.1002/aqc.3954>

CHAPITRE 07

Paroles d'expert ↙

L'ADNe pour évaluer l'effet des pressions anthropiques sur la biodiversité marine



David Mouillot,
professeur à l'Université de Montpellier, UMR MARBEC

Les Aires Marines Protégées (AMP), et particulièrement les réserves interdisant toutes activités de pêche, sont les principaux outils de gestion pour enrayer l'érosion de la biodiversité marine. Or elles ne représentent pas forcément un état de référence car la pression de pêche à leurs périmètres, et la pollution sonore due à la pression touristique à l'intérieur de leurs limites, peuvent nuire à leur efficacité de conservation. En guise d'alternatives, les zones isolées ou quasi vierges de pressions peuvent fournir un point de référence plus approprié. Cependant, de telles zones sont pratiquement absentes des régions côtières, y compris en mer Méditerranée, densément peuplée et exploitée depuis des millénaires. Dans le cadre de Vigillife, nous cherchons à établir un état de référence de la biodiversité marine afin d'évaluer les stratégies de conservation et de restauration des zones côtières.

En août 2023, c'est en Italie, dans la mer Tyrrhénienne située à l'Est de la Corse, que nous avons échantillonné les dernières zones relativement intactes de la Méditerranée Nord-Occidentale. L'île de Monte-Cristo est en effet l'une des seules réserves marines qualifiée de « no-entry », interdisant tout accès à l'Homme, de la pêche aux activités touristiques. Nous y avons effectué des comptages visuels en plongée sous-marine pour estimer l'abondance des poissons et des filtrations d'ADNe pour détecter la biodiversité en poissons et en crustacés. Ces sites resteront au cœur de notre stratégie dans les prochaines années pour mieux comprendre la dynamique à long terme des écosystèmes marins côtiers avec peu d'influence humaine directe mais affectés par le changement climatique. Nous évaluerons avec attention la capacité de ces derniers sanctuaires à procurer des refuges climatiques et anthropiques.

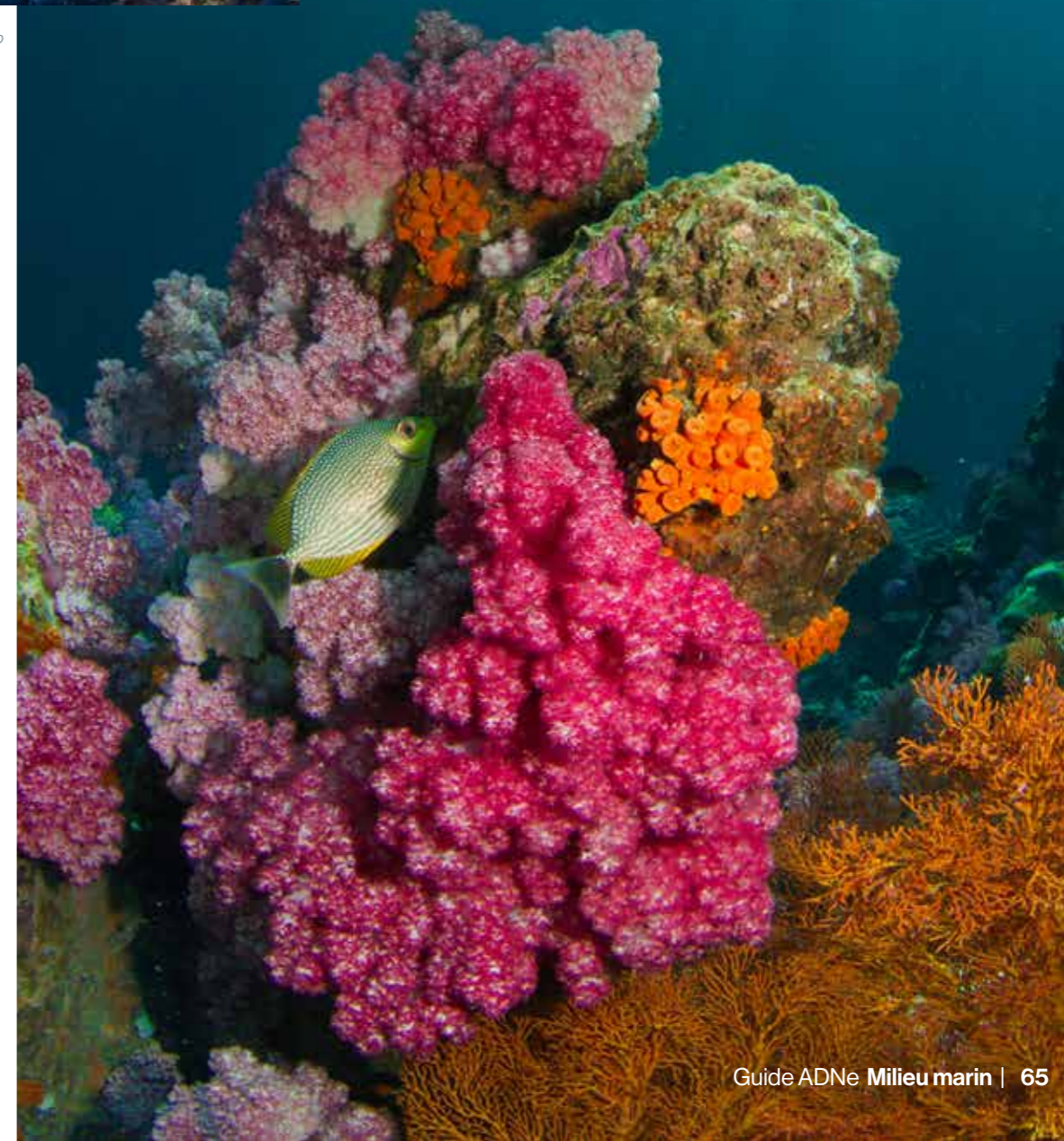
L'arrêt de la plupart des activités humaines « de plein air » pendant les premiers stades de la pandémie du COVID-19 constitue une « expérience naturelle » unique pour mieux comprendre l'influence de la présence humaine sur la faune et évaluer le rebond potentiel de la biodiversité en cas de perturbations réduites. Plages inaccessibles au public, activités touristiques interdites et diminution de la pêche, cette « anthropause » forcée a considérablement réduit les pressions humaines en mer et sur le littoral entre mars et juin 2020. Cet événement sans précédent a fourni une nouvelle base de comparaison pour évaluer l'érosion de la biodiversité en poissons et la capacité des AMP à maintenir cette biodiversité dans des écosystèmes côtiers habituellement dominés par l'homme. En filtrant l'ADNe à l'intérieur et à l'extérieur des réserves pendant cette période, et en comparant les résultats à ceux des années précédentes, nous avons démontré une augmentation de biodiversité de 30 % lors de l'arrêt des activités humaines au printemps 2020, suggérant que les réserves ne constituent pas un état de référence absolu et que la pression humaine, au-delà de la pêche, érôde la biodiversité plus qu'attendu.



Échantillonnages réalisés dans la Réserve Naturelle Marine de Monte-Cristo © Ewann Tregarot



Réserve naturelle marine de Monte-Cristo © Ewann Tregarot



PARTIE 04

04

Agir dans les territoires



CHAPITRE 08

Limites et avantages de l'ADNe ⁰⁸

Limites

→ MÉTHODES D'INVENTAIRE CONVENTIONNELLES ET ADNe, DES LIMITES COMMUNES

Comme pour l'ensemble des autres méthodes d'inventaires existantes, les outils basés sur l'analyse de l'ADNe sont susceptibles de produire des faux-positifs et des faux-négatifs. Ces biais d'interprétation peuvent découler de choix méthodologiques inadaptés aux besoins de l'utilisateur ou de pratiques inadéquates contribuant à la contamination et la dégradation des échantillons récoltés. En effet, chaque étape du processus, du prélèvement aux analyses bioinformatiques, offre un large panel de méthodes plus ou moins optimisées pour répondre aux objectifs fixés au départ (groupe taxonomique ciblé, site d'étude d'intérêt, applications, etc.). Par exemple, les faux-négatifs peuvent être causés par un effort d'échantillonnage insuffisant ou par un plan d'échantillonnage inapproprié ne permettant pas de collecter l'ADN de(s) l'espèce(s) ciblée(s). Ils peuvent également résulter d'une dégradation de l'ADN,

lorsque les précautions de manipulation et de conservation des échantillons ne sont pas respectées. Inversement, les faux-positifs peuvent être causés par des contaminants extérieurs introduits dès l'échantillonnage ou pendant l'analyse. Ainsi, tout comme pour les méthodes d'inventaire traditionnelles, les résultats issus d'une analyse de l'ADNe peuvent nécessiter une validation par un expert écologue ou une utilisation combinée avec une autre méthode complémentaire de recensement de la biodiversité. Également, à l'heure actuelle, aucune méthode d'inventaire, qu'elle soit traditionnelle

ou basée sur l'analyse de l'ADNe, ne permet d'identifier des espèces hybrides ou l'occurrence d'une introgression génétique au sein d'une population. En effet, ces différents cas de figure nécessitent des analyses génétiques approfondies réalisées à partir de tissus des organismes concernés ainsi qu'une validation par un expert (taxonomiste de préférence) en parallèle.

→ LIMITES BIOLOGIQUES

Les analyses de l'ADNe se basent sur la détection de traces d'ADN dans l'environnement et non sur l'observation directe des organismes dans leur milieu. Ainsi, les données individuelles telles que l'âge, le sexe, la taille ou l'état de santé des individus ne peuvent pas être obtenues. De la même manière, une quantification absolue des espèces détectées ne peut être réalisée. En effet, les quantités d'ADN produites et relarguées par les organismes varient d'un groupe taxonomique mais également d'un individu à l'autre en raison de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (état de stress, comportement et âge des individus, température du milieu, etc.). Néanmoins, il existe une corrélation positive entre la biomasse des individus dans le milieu et les concentrations de matériel génétique récoltées²⁵. Ainsi, l'analyse de l'ADNe peut, dans certains cas, être un indicateur, ou proxy, de l'abondance des espèces. Il est également difficile d'étudier des espèces consommées ou élevées car les traces de leur ADN peuvent être omniprésentes dans l'environnement du fait des rejets anthropiques (stations d'épuration, stations aquacoles, etc.). Au-delà des espèces d'intérêt économique, l'étude de certains taxons peut être limitée en raison d'une résolution taxonomique trop faible pour le marqueur sélectionné (par exemple, certaines espèces génétiquement trop proches ne peuvent pas être distinguées avec des amorces classiques) ou d'un manque de complétude des banques de références génétiques utilisées.



© Greg Lecœur, WE ARE MEDITERRANEE



© Greg Lecœur, WE ARE MEDITERRANEE

→ LIMITES TECHNIQUES

Du fait des différentes étapes réalisées au laboratoire, les délais d'une analyse de l'ADNe sont plus longs par rapport aux méthodes traditionnelles (Cf. chapitre 3). La détection de certaines espèces revêt des enjeux importants lors d'inventaires et de suivis de la biodiversité. Il est donc primordial de s'assurer de l'absence de contamination du matériel utilisé. En conséquence, les analyses ADNe emploient de nombreux consommables à usage unique accumulant ainsi les déchets. Les enjeux pour l'avenir consisteront à limiter ces derniers et promouvoir une filière de recyclage pour limiter les impacts d'un outil destiné à protéger la biodiversité.

Avantages

→ AVANTAGES ÉCOLOGIQUES

Malgré un certain nombre de limites, les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe ont fait leurs preuves en milieu aquatique pour la détection simultanée, et à partir d'un seul échantillon d'eau, d'espèces appartenant à différents groupes taxonomiques. Grâce à ces méthodes sensibles, il est désormais possible d'étudier les organismes difficilement observables par les méthodes classiques car rares (très faible densité), trop petites ou présentes uniquement à un stade larvaire. Elles s'avèrent particulièrement utiles dans le cas d'espèces difficilement capturables qui requièrent un échantillonnage trop laborieux, coûteux, dangereux ou invasif. L'analyse de l'ADNe peut également être un outil non négligeable pour la détection précoce d'espèces non indigènes potentiellement invasives ainsi que difficilement différenciables à l'œil nu, surtout dans un contexte où les experts naturalistes et taxonomistes sont trop peu nombreux face aux menaces pesant sur la biodiversité.

→ AVANTAGES TECHNIQUES

Au-delà de la sensibilité accrue des méthodes ADNe, elles sont faciles à mettre en œuvre et ne nécessitent que des autorisations d'accès aux sites d'échantillonnage à l'inverse d'autres méthodes d'inventaire plus invasives. Elles permettent de réduire les biais dus aux conditions de terrain potentiellement défavorables (conditions d'observation), aux erreurs associées à l'expérience de l'observateur et à la variabilité des efforts de prospection et ce alors que l'échantillonneur peut être formé en seulement quelques heures. Les périodes passées sur le terrain peuvent être plus larges sur la saison et plus flexibles sur la journée. Les prélèvements sont non invasifs et peuvent être réalisés sans toucher les individus, réduisant ainsi les sources

“ Au-delà de la sensibilité accrue des méthodes ADNe, elles sont faciles à mettre en œuvre. ”

de stress potentielles et le transfert de potentiels pathogènes. Pour ces mêmes raisons, il est également possible d'échantillonner dans des zones où la plongée et la pêche sont interdites pour protéger les espèces, comme les aires marines protégées par exemple, ou en raison de la dangerosité ou du niveau de pollution du site (ports, Energies Marines Renouvelables (EMR), etc.). Les méthodes basées sur l'analyse de l'ADNe assurent ainsi une plus grande sécurité du personnel impliqué. Sur le terrain, elle permet donc un gain de temps et d'énergie dont découle un ratio coûts/rendements souvent plus intéressant.



© Greg Lecœur, WE ARE MEDITERRANEE

CHAPITRE 08

Paroles d'expert ↙

Avantages et limites des outils ADNe par rapport aux méthodes traditionnelles



Pierre Boissery,
Expert eaux côtières et littoral méditerranéen, Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse

L'ADN environnemental (ADNe) est un outil récent au service de la biodiversité. Comme à chaque fois qu'apparaît un outil nouveau, les réactions varient, de l'enthousiasme à la méfiance.

L'enthousiasme est porté par le nouvel horizon que cette technique d'analyse ouvre : on va pouvoir établir des inventaires, rapidement, de manière non invasive ni destructrice, dans des milieux complexes, en premier screening. L'ADNe est rassurant. Cela relève de la chimie. C'est souvent considéré comme plus précis que le vivant. Plus besoin d'être en capacité de reconnaître toutes les espèces sur un site. Plus besoin de passer des heures, parfois caché à espérer faire l'inventaire le plus exhaustif. Il suffit de prélever et d'analyser en laboratoire des échantillons d'eau et de comparer les séquences ADN obtenues à une base de références génétiques pour identifier rapidement les espèces. Facile et rassurant pour un gestionnaire de milieu aquatique, non ?

Les naturalistes sont beaucoup plus réservés. La machine et la chimie ne remplaceront pas l'expertise du sachant. La méthode est parfois considérée par certains, à l'opposé, peu fiable, car les bases de références sont incomplètes, et coûteuses dans son déploiement et ses analyses. Finalement, pourquoi utiliser une méthode aussi critiquable en lieu et place des experts naturalistes, beaucoup plus compétents. L'ADNe n'est pas à privilégier. Il ne doit pas entrer en concurrence avec le savoir de l'expert. Tout n'est pas faux.

Avec une certaine prise de recul, on peut facilement positionner l'utilisation de l'ADNe comme un outil de premier screening, complémentaire de l'expertise du naturaliste. Ceci est d'autant plus vrai qu'à l'image de la chimie, disposer d'une liste de molécules chimiques et des concentrations ne fait pas un diagnostic environnemental. La machine ne fait pas tout. Il faut forcément quelqu'un pour interpréter le résultat des analyses et en l'occurrence, c'est bien le rôle du naturaliste. En ces termes, l'ADNe est un outil nouveau et complémentaire qui peut être facilement déployé, préalable pourquoi pas à un terrain plus poussé. D'autant plus qu'à ce jour, la méthode ADNe est limitée à une évaluation qualitative. Elle ne permet pas de donner d'informations sur les classes de taille ou bien le nombre d'individus. L'œil, lui, sait compter.

L'ADNe est un outil complémentaire de l'expertise naturaliste. Prenons quelques exemples. Un bon spécialiste des poissons de Méditerranée peut reconnaître facilement et en moyenne une 60aine d'espèces lors de ses plongées. La Méditerranée abrite environ 17 000 espèces de poissons. La base de données actuelle contient la signature ADNe de 600 espèces de poissons. Si je couple l'expertise de mon plongeur à mes analyses ADNe, mon diagnostic sur les poissons sera sans doute plus complet, d'autant qu'un plongeur ne peut pas rester indéfiniment sous l'eau, ni pratiquer les fonds de grandes profondeurs. Pour les

grands fonds, on peut toujours pêcher. Cette technique a une certaine efficacité, mais il est de moins en moins pertinent de détruire la nature pour l'étudier. Effectivement, un inventaire de poissons ayant recours à la technique de l'ADNe a un coût. Il n'est pas forcément plus élevé qu'un chalut en mer qui réalise une campagne d'échantillonnage ou d'une équipe de plongeurs désireux de faire des inventaires. Finalement prélever de l'eau en mer reste une manipulation simple, réalisable par un technicien.

Au contraire, l'ADNe remet en évidence le besoin de naturaliste. Par la multiplication des inventaires qui peuvent être réalisés facilement, le besoin d'expertise naturaliste va devenir plus prégnant. C'est sans doute l'occasion pour cette expertise plutôt en retrait ces dernières années de revenir au premier plan et de former de nouveaux spécialistes aptes à utiliser la technique de l'ADNe. On ne peut pas regretter de disposer de nos jours d'un outil complémentaire, prometteur en performance et riche en perspectives pour être meilleurs dans nos diagnostics et *in fine* dans la définition des mesures correctives.

“ L'ADNe est un outil complémentaire de l'expertise naturaliste. ”



© Aurélie Lacoeylle



© Greg Lecoecur, WE ARE MEDITERRANEE



© Greg Lecoecur, WE ARE MEDITERRANEE





CHAPITRE 09

Mieux connaître pour mieux protéger ⁰⁹

Ces nouvelles technologies basées sur l'analyse de l'ADNe ouvrent des horizons fascinants dans notre compréhension du vivant. Au-delà des frontières de la science pure, ces avancées offrent des connaissances inédites et robustes, éléments indispensables à toutes décisions et actions sociétales. Elles offrent des perspectives encore jamais atteintes en termes de changement d'échelles temporelle, spatiale et dans le spectre du vivant puisqu'elles permettent d'explorer toutes les ramifications de l'arbre phylogénétique. Il est donc important de transformer ces connaissances en actions tangibles en couplant un besoin exprimé par un utilisateur avec une réponse scientifique adaptée.

Paroles d'expert ↙

Détection précoce des espèces non indigènes (ENI)



Stefano Varrella
Département Sciences de la vie et de l'environnement,
Université polytechnique des Marches (Italie)



Roberto Danovaro
Département Sciences de la vie et de l'environnement,
Université polytechnique des Marches (Italie)



Cinzia Corinaldesi
Département Sciences de la vie et de l'environnement,
Université polytechnique des Marches (Italie)

La mondialisation du transport maritime et des échanges favorise la prolifération des ENI. Certaines ENI peuvent s'installer dans une nouvelle zone et devenir invasives, entraînant des conséquences négatives pour la biodiversité locale et le fonctionnement des écosystèmes. La majorité des ENI peut être introduite par le transport maritime, et les ports commerciaux et touristiques représentent ainsi un point de contrôle pour l'introduction des ENI dans de nouveaux environnements marins et leur diffusion dans les zones environnantes. Il y a une prise de conscience croissante de l'importance de détecter et d'identifier rapidement la présence des premiers stades de développement des ENI, qui sont parfois difficiles à reconnaître par les taxonomistes experts, car une fois établis, il est peu probable de les éradiquer.

L'Université polytechnique des Marches (UNIVPM) et l'Institut italien de protection de l'environnement et de la recherche (ISPRA) ont développé de nouveaux protocoles pour la détection des ENI par metabarcoding de l'ADN environnemental dans des échantillons d'eau de mer et de sédiments collectés dans différents ports méditerranéens de manière saisonnière et ont comparé les résultats avec des approches taxonomiques classiques. Ce protocole est basé sur une procédure standardisée, de l'échantillonnage à l'analyse bioinformatique, et se révèle fiable pour la détection des espèces marines. Dans l'ensemble, le metabarcoding de l'ADNe, utilisant plusieurs marqueurs moléculaires (c.-à-d., ARNr 18S, COI et rbcL), a révélé la présence de deux fois plus d'espèces que les analyses morphologiques, mais seulement quelques-unes (environ 5 %) ont été détectées par les deux approches. En comparant les résultats obtenus par les approches moléculaires et morphologiques pour l'identification des ENI, le pourcentage d'espèces communément détectées ne s'élève qu'à 8 %. Plus de la moitié des ENI ont été identifiées exclusivement par metabarcoding de l'ADNe, signalant certains nouveaux taxa jamais identifiés dans les environnements côtiers italiens et même d'autres jamais signalés dans le bassin méditerranéen. Le metabarcoding de l'ADNe est un outil très sensible pour identifier la présence dans l'eau de mer de signatures génétiques des ENI des substrats durs et mous pendant leur saison de reproduction. Cependant, pour avoir une image détaillée des ENI présentes dans les zones sensibles, une intégration des approches morphologiques et moléculaires est nécessaire. La combinaison d'approches technologiques de pointe et traditionnelles est essentielle pour détecter et cartographier rapidement les ENI à grande échelle. Cette intégration est cruciale dans le cadre des directives nationales et internationales, car elle facilite la mise en œuvre de stratégies de prévention plus efficaces tout en minimisant les impacts écologiques.



CHAPITRE 09

Paroles d'expert ↙

Gérer les espaces naturels



Madeleine Cancemi,
Directrice générale du Parc Naturel Marin du Cap Corse
et de l'Agriate



Ile de Giraglia - réserve naturelle des îles du Cap © Eric Volto



Requin ange © Laurent Ballesta, Andromède Océanologie

Depuis son établissement en 2019, le Parc Naturel Marin du Cap Corse et de l'Agriate, sous l'égide de l'Office Français pour la Biodiversité, se consacre à la protection du milieu marin et au développement durable des activités maritimes. Fondé sur une connaissance approfondie des écosystèmes, il mène des actions de sensibilisation auprès des différents usagers de la mer.

Dès notre lancement, nous nous sommes tournés vers les méthodes basées sur l'analyse de l'ADN environnemental dans l'objectif de détecter des espèces profondes et cryptiques, difficilement observables en plongée. Une première étude menée entre 2019 et 2020 a ainsi mis en lumière la présence de zones refuges pour une grande diversité d'espèces d'élastranchons dont des espèces en danger critique d'extinction comme la raie blanche ou la raie aigle. Ces analyses ont également révélé la présence d'une espèce invasive jusqu'alors inconnue dans la région, la sole sénégalaise.

Fort de cette expérience initiale, nous avons mené une seconde étude au sein du Parc et au-delà (plaine orientale) en utilisant une approche spécifique pour cibler l'ange de mer, espèce de requin en danger critique d'extinction et disparue du continent. Les résultats ont mis en évidence une corrélation positive entre la présence de cette espèce emblématique et le comportement de reproduction des picarels. Nos découvertes ont permis de souligner l'importance des nids de picarels comme lieux de regroupement pour l'alimentation de l'ange de mer, révélant ainsi l'existence de zones refuges cruciales dans les eaux corses.

Nos efforts ne se limitent pas à la recherche scientifique. Ils revêtent également une dimension pratique et éducative, visant à sensibiliser pêcheurs et usagers sur l'importance de ces espèces et sur la nécessité de pratiques de pêche responsables pour réduire les captures accidentelles et encourager à relâcher les prises annexes.

Le Parc envisage de poursuivre ses recherches en menant des échantillonnages à grandes profondeurs (1500 m) afin de confirmer la présence d'une autre espèce rare, la baleine de Cuvier dont des traces d'activité de nourrissage ont été observées au niveau des monts sous-marins. Parallèlement, nous lançons un projet visant à évaluer l'état génétique de la population de grands dauphins résidant dans le parc. Des filtrations vont ainsi être réalisées dans le sillage des individus identifiés afin de réaliser des analyses d'ADN haplotypique à partir de l'ADNe récolté. Enfin, l'application des techniques basées sur l'ADNe se révèle être un outil prometteur pour la gestion et la préservation de la biodiversité marine. Ces méthodes pourraient permettre la localisation précise d'espèces d'intérêt faisant l'objet d'arrêtés préfectoraux tels que le corb ou le mérout.

Paroles d'expert ↙

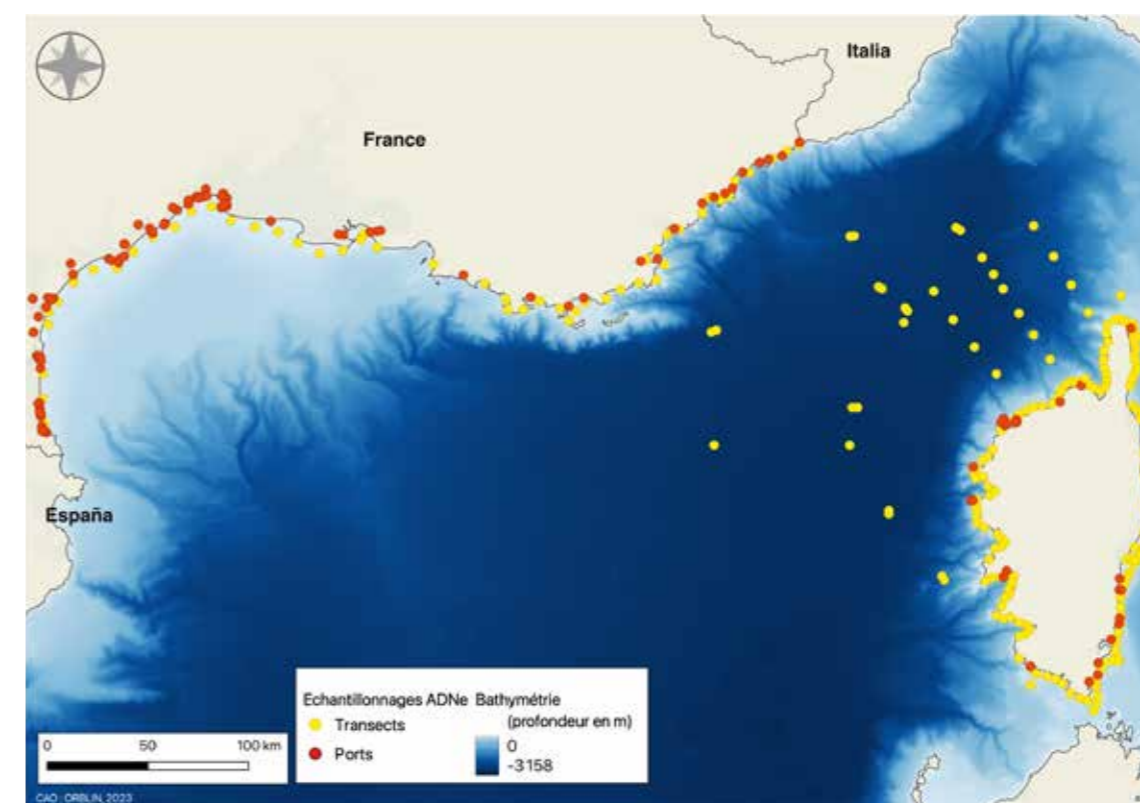
Cartographier la Mer Méditerranée - BioDivMed



Pierre Boissery,
Expert eaux côtières et littoral méditerranéen, Agence de
l'eau Rhône Méditerranée Corse



Équipe OceanoScientific de collecte d'ADNe du catamaran LOVE THE OCEAN à bord du Vanguard-Suzuki équipé de la pompe de filtrage et du support inventé par Yvan Griboval



La caractérisation de la biodiversité des eaux côtières est une ambition forte pour l'agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. Jusqu'à présent, cette ambition ne s'est matérialisée que par des études annuelles de portée régionale. Le bilan pour la façade ne s'établissant ainsi qu'au bout d'une période de trois années, avec des conditions de milieux inhérentes à chaque période annuelle. La logistique tant sur le plan matériel que sur le plan humain pour les investigations de terrain est difficile à déployer sur une même période et dans un laps de temps court. L'élément limitant n'étant pas la partie logistique, mais bien la partie acquisition de données *in situ* qui nécessite de longues périodes d'immersion en plongée sous-marine. Le recours à l'utilisation de l'ADNe comme outil de screening de cette biodiversité et la bonne articulation de 3 campagnes océanographiques ont permis lors de l'opération BioDivMed 2023 de pouvoir réaliser un état des lieux sur la totalité des eaux côtières de la Méditerranée française, dans un laps de temps court de 2 mois. Ainsi, pour la première fois depuis l'étude de cette biodiversité, une image complète et « instantanée » va être établie. Nous disposerons en 2024 d'un état des lieux de la vie marine présentant une exhaustivité jamais obtenue grâce aux 800 stations de prélèvements opérés par les trois partenaires que sont Andromède Océanologie, We are Méditerranée et OceanoScientific. Les analyses effectuées par SPYGEN et l'interprétation réalisée par l'Université de Montpellier vont permettre d'établir une base de données mondiale pour son ampleur dans la caractérisation de la biodiversité marine des eaux côtières d'un pays riverain à la Méditerranée.

Paroles d'expert ↙



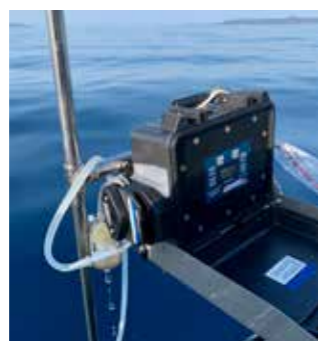
Yvan Griboval,
Président OceanoScientific
& Président SAS LOVE THE OCEAN



Remise des 104 échantillons d'ADNe prélevés par l'équipe OceanoScientific au Professeur David Mouillot (à gauche) sous la direction de Yvan Griboval (2e en partant de la gauche) en présence des quatre membres de son équipe. © OceanoScientific



Collecte d'ADNe au Cap de Saint-Tropez : le biologiste Léni Guillotin va mettre la crépine à l'eau et Yvan Griboval pilote le Vanguard-Suzuki. © OceanoScientific



Pompe en action sur son support mis au point par OceanoScientific pour garantir une égale qualité de collecte en toutes circonstances. © OceanoScientific



Les collectes d'ADNe le long du littoral méditerranéen ont été effectuées principalement au lever du jour pour bénéficier d'une mer plate. © OceanoScientific

«Comment préserver quelque chose qu'on ne connaît pas précisément ?» Lorsque Pierre Boissery (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse), puis le Professeur David Mouillot (Unité Mixte de Recherche MARBEC - Université de Montpellier) m'ont exposé les avantages de l'usage de l'ADN environnemental (ADNe) pour une meilleure connaissance scientifique des espèces de poissons et de crustacés, j'ai mesuré l'intérêt de collaborer au projet qui n'était pas encore la Mission BioDivMed. Plus la connaissance de la Nature est scientifiquement précise, plus sa conservation et sa préservation sont possibles. Nous sortons de la zone des vœux pieux pour nous engager dans une démarche concrète aux résultats garantis.

Notre première action, avant même de démarrer la collecte de 104 échantillons de Menton à Gruissan, à la voile sans émission de CO2 avec notre catamaran LOVE THE OCEAN en 52 Stations durant 23 jours de juillet 2023, a été de concevoir un matériel pour dupliquer les collectes d'échantillons avec le maximum de rigueur. L'expérience acquise depuis 2006 auprès d'éminents scientifiques et sa mise en œuvre - notamment durant notre tour du Monde à la voile en solitaire pour mener soixante jours d'une campagne inédite sous le 40e parallèle Sud, sous les trois grands caps continentaux : Bonne-Espérance, Leeuwin et le Cap Horn - m'a appris que la qualité d'une étude scientifique dépend d'abord de la rigueur apportée à la collecte des échantillons à étudier.

Nous avons donc conçu et mis au point le matériel qui permet de collecter des échantillons d'ADNe avec une grande précision : toujours à la même profondeur, en réduisant les risques de pollution des échantillons par une maîtrise rigoureuse de la mise en œuvre de la crépine qui recueille l'eau de mer. Au terme de la Mission BioDivMed 2023, nous avons amélioré ce matériel. Il est désormais au point pour mener des «Missions BioDiv» le long de n'importe quel littoral.

Mais la raison la plus importante de notre engagement est de participer à une recherche scientifique, non seulement pour favoriser la préservation de la Nature, spécifiquement de la biodiversité marine, mais, surtout, d'œuvrer au sein du Consortium BioDivMed au profit de l'Humanité. Car lorsque les Sites Sentinelles de Biodiversité Marine (SSBM) seront en place, la connaissance scientifique de la biodiversité permettra de quantifier chacune des espèces identifiées. Nous favoriserons alors concrètement : «Une pêche côtière durable pour une alimentation durable en circuits courts».



Paroles d'expert ↙



Greg Lecoeur,
Photographe,
Président de l'association We Are Méditerranée

Photographe naturaliste, spécialisé dans le monde sous-marin, j'ai toujours rêvé de pouvoir approcher la photographie du monde scientifique.

L'association We are Méditerranée a été créée pour rassembler une communauté d'experts et de passionnés du monde marin afin de concrétiser le souhait de préservation de l'environnement, et plus particulièrement la Mare Nostrum. Cette association combine vision photographique, approche scientifique et dimension éducative pour accomplir quatre missions principales : explorer, étudier, protéger et sensibiliser.

Notre engagement se reflète dans notre participation au projet BioDivMed à travers l'Expédition Pelagos. Cette initiative associe des expéditions naturalistes à des missions scientifiques pour approfondir la connaissance et la protection du sanctuaire Pelagos, dédié à la préservation des mammifères marins et leur habitat.

En 2023, nous avons sillonné la Mer Méditerranée durant les mois de mai et juin, prélevant 25 échantillons pour déployer une approche multi spécifique basée sur l'analyse de l'ADNe.

L'ADNe est un outil non invasif, innovant et révolutionnaire permettant de découvrir les mystères de la biodiversité sans perturber les écosystèmes. Bien que cette technologie reste perfectible, notamment pour la détection d'espèces de dauphin génétiquement très proches par exemple, l'ADNe facilite d'ores et déjà la détection d'espèces souvent difficiles à observer, telles que le phoque moine ou le requin blanc par exemple et simplifie les suivis écologiques.

Au-delà de cet aspect scientifique de plus en plus reconnu par la communauté, l'ADNe est également un puissant outil de communication et de sensibilisation. Comme nous l'a prouvé le projet BioDivMed, l'ADNe permet de drastiquement changer l'échelle spatiale des études de biodiversité. L'envergure des expéditions menées suscite l'intérêt et attise la curiosité d'un large public, permettant ainsi de toucher le plus grand nombre. Le travail photographique couplé aux résultats des expéditions scientifiques permet de produire des visuels percutants et de véhiculer des messages forts, compréhensibles et marquants pour le grand public.



CHAPITRE 09

Paroles d'expert ↙

Surveiller



Florian Holon,
Directeur général d'Andromède-Océanologie



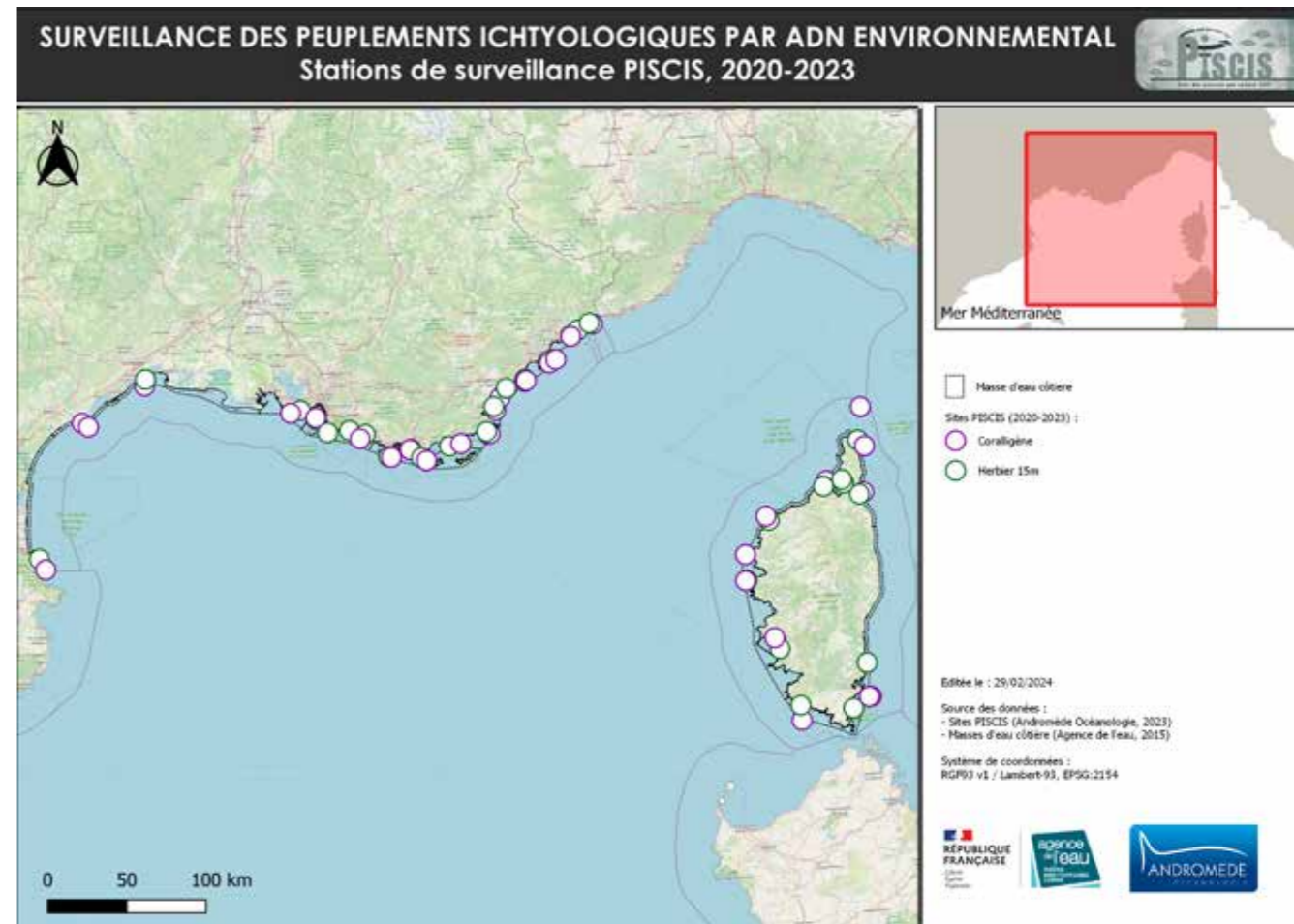
Herbier © Andromède Océanologie

Andromède Océanologie utilise l'ADNe pour ses activités professionnelles et travaille à l'amélioration de la technique et des méthodes d'échantillonnage. En 2016, la société Andromède Océanologie s'est associée à l'Université de Montpellier pour créer le laboratoire commun InToSea. Dans le cadre de ce laboratoire commun, un prototype de pompe étanche a été développé pour échantillonner l'ADN environnemental directement dans l'eau de mer jusqu'à une profondeur de 150 m. Ce prototype et ses versions améliorées sont depuis utilisés chaque année en Méditerranée française pour différents projets de surveillance biologique (PISCIS), d'exploration (expéditions scientifiques Gombessa 5 et 6) ou de recherche scientifique (projets ANGE, PIAF...). Les protocoles sont ajustés pour répondre au mieux à la question scientifique : échantillonnage statique de fond, par transect de fond sur plusieurs kilomètres, couplage ADNe/caméras, développement d'un barcode spécifique de l'ange de mer... En 2021, un nouveau prototype dédié aux grands fonds a été développé. Plusieurs centaines de filtrations ont ainsi été réalisées de la surface jusqu'à 1500 m de profondeur.

Parmi nos expériences les plus marquantes en ADNe, nous pouvons citer leur utilisation dans le cadre de la surveillance des eaux côtières. Soutenu par l'Agence de l'eau, le réseau PISCIS est opéré depuis 2015 afin de caractériser les assemblages ichthyologiques. Une campagne régionale annuelle sur la période mi-mai/fin juin est réalisée sur l'ensemble de la façade méditerranéenne française bordée par les trois régions. La méthode choisie pour la caractérisation des assemblages ichthyologiques entre 2015 et 2019 était une acquisition vidéo réalisée à partir de caméras offrant un champ de vision à 360°. Depuis 2020, la méthode utilisée a changé pour l'ADN environnemental. Soixante-quinze stations ont ainsi pu être échantillonnées dans le cadre de PISCIS sur les trois régions de Méditerranée française entre 2020 et 2023. Parmi ces stations, 37 correspondaient à l'habitat Herbier de posidonie (sites TEMPO) et 38 à l'habitat récifs coralligènes (sites RECOR). La caractérisation des peuplements de poissons par ADNe continue en 2024, 2025 et 2026 pour 58 stations PISCIS dans le cadre du marché de la surveillance biologique des eaux côtières des bassins Rhône Méditerranée et Corse lancé par l'Agence de l'eau.

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. Pour chaque site de surveillance deux kits VigiDNA DW2 sont utilisés (soit deux échantillons par site). Les prélèvements sont réalisés à l'aide d'une pompe étanche déposée sur le fond. Une plaquette descriptive de cette méthode ADNe est disponible sur la plateforme MEDTRIX, projet PISCIS.

La plateforme de surveillance des eaux côtières et des écosystèmes de Méditerranée MEDTRIX (www.medtrix.fr) permet d'héberger et de diffuser l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce réseau PISCIS. Au-delà des 174 espèces de poissons détectées jusqu'à présent, huit descripteurs et indices de diversité sont calculés suivant les espèces détectées par ADNe : la richesse spécifique, la diversité fonctionnelle, l'indicateur LRFI (Large Reef Fish Indicator), l'indicateur



Coralligène © Andromède Océanologie

crypto-benthique, l'indicateur thermique, l'indicateur non indigène, l'indicateur UICN, le ratio démerso-pélagique/benthique. Ces indicateurs sont calculés à différentes échelles : site (deux habitats confondus), site-habitat (habitat pour chaque site), habitat (tous sites confondus). Pour la majorité des indicateurs, les résultats montrent que les sites d'herbier à -15 m présentent des valeurs similaires ou légèrement plus élevées que l'habitat coralligène. Ainsi, la richesse spécifique, la diversité fonctionnelle et l'indicateur LRFI sont globalement plus importants sur les sites d'herbier. Depuis 2020, le réseau PISCIS a permis de détecter des espèces rares et à haut statut de conservation (UICN). De nombreuses espèces de chondrichthyens ont été inventoriées : le requin renard (*Alopias vulpinus*) en 2021, l'émissole (*Mustelus mustelus*) en 2022, la raie blanche (*Rostroraja alba*) en 2023, toutes trois en danger d'extinction, ou encore une détection en 2023 d'une raie aigle vachette (*Aetomylaeus bovinus*) en danger critique d'extinction. Les espèces emblématiques de la Méditerranée ont aussi été inventoriées comme le mérrou brun (*Epinephelus marginatus*), le corb (*Sciaena umbra*) ou encore l'Ange de mer (*Squatina squatina*).



Tous les rapports et publications associées sont disponibles sur la page du projet PISCIS.
https://medtrix.fr/portfolio_page/piscis/



Echantillonnages réalisés dans le cadre du programme Aires Marines Sentinelles © David Mouillot



Paroles d'expert ↙

Le programme scientifique Vigilife Aires Marines Sentinelles



David Mouillot, professeur à l'Université de Montpellier, UMR MARBEC

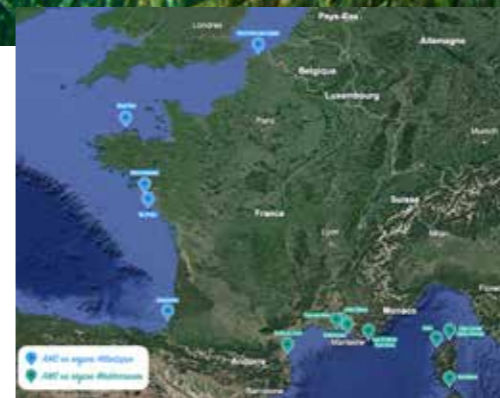
Le programme Aires Marines Sentinelles, co-financé par EDF et l'Agence de l'Eau RMC, s'est fixé trois objectifs pour pallier au déficit de connaissances dans les suivis actuels de la biodiversité marine : (1) effectuer des inventaires quasi-exhaustifs et standardisés sur de nombreux groupes taxonomiques (poissons osseux et cartilagineux, crustacés et mammifères marins), (2) inscrire ces inventaires dans une stratégie à long terme pour évaluer les impacts des changements globaux (climatiques et anthropiques), et (3) impliquer les partenaires locaux dans la collecte, l'analyse, l'interprétation et la valorisation des données.

Une Aire Marine Sentinelle (AMS) doit donc présenter un intérêt pour le suivi et/ou la conservation des espèces marines. Elle est constituée de plusieurs sites, certains étant considérés comme « traités » donc ayant subi une intervention humaine qu'elle soit de nature positive (restauration ou protection) ou négative (impactante ou perturbante), et d'autres sites comme « témoins » ou « contrôles » qui n'ont pas subi cette intervention humaine mais qui sont comparables aux sites traités (même habitat ou environnement). Certaines AMS concernent les réserves marines et leurs extérieurs proches. D'autres sont des parcs éoliens (St Nazaire) qui sont considérés comme un traitement d'un milieu naturel déjà anthropisé sans que nous puissions à ce stade dire s'il y a une incidence écologique négative (impact sur l'habitat) ou positive (réduction de la pression de pêche). Enfin les actions de restauration comme la mise en place de récifs artificiels feront aussi l'objet de suivis de type AMS.



Ce programme a débuté en 2023 avec une quinzaine d'AMS placées stratégiquement depuis la Manche jusqu'à la Corse pour quadriller les côtes françaises métropolitaines et apporter des signaux précoces d'arrivée d'espèces non indigènes mais aussi pour évaluer la dynamique locale d'espèces menacées (extirpation ou recolonisation). En impliquant les partenaires locaux (gestionnaire de parcs éoliens ou de réserves marines), le programme ambitionne aussi de fédérer une communauté d'acteurs qui devraient à terme réaliser leurs échantillonnages ADNe en autonomie, partager leurs données via une plateforme cartographique et contribuer au développement d'indicateurs pertinents de l'état des écosystèmes marins.

Ce programme AMS a pour vocation de se développer sur des sites hors métropole et à l'étranger pour étendre cette surveillance à long terme des eaux côtières avec des protocoles standardisés multi-taxa.



Carte des Aires Marines Sentinelles échantillonnées en 2023 © David Mouillot

Echantillonnages réalisés dans le cadre du programme Aires Marines Sentinelles © David Mouillot



Pour en savoir plus : <https://www.vigilife.org/nos-programmes/>

Conclusions & perspectives

Conclusions

L'analyse de l'ADNe consiste à prélever et identifier les traces d'ADN laissées par les organismes dans leur environnement. Depuis 2008, cette méthode novatrice, complémentaire aux méthodes conventionnelles de recensement de la biodiversité, a démontré son efficacité dans le domaine de la biologie de la conservation, notamment pour la réalisation d'inventaires et de suivis de la biodiversité. Cependant, en milieu aquatique, et particulièrement en milieu marin, les quantités d'ADNe tendent à être très faibles dans l'eau. Elles peuvent même être infimes dans le cas d'espèces peu abondantes dans l'environnement (menacées, cryptiques, etc.). Or, la détectabilité des espèces dépend de la probabilité de prélever leur ADN dans le milieu, de la préservation de cet ADN au cours du processus analytique et de l'absence de contamination des échantillons considérés. Ainsi, lorsque l'objectif de l'utilisateur est d'obtenir une liste d'espèces la plus exhaustive possible tout en limitant les risques de faux-négatifs et de faux-positifs, il est nécessaire de choisir des méthodes d'échantillonnage et d'analyse respectant les plus hauts niveaux de précaution possibles. Vigilife s'appuie donc sur des méthodes basées sur l'ADNe et développées en ce sens pour bâtir une démarche partenariale en faveur

de la biodiversité. L'objectif de ce guide était de fournir une synthèse simplifiée des méthodes couramment utilisées, ainsi que des instructions opérationnelles pour la mise en œuvre des méthodes Vigilife. Il est prévu de le mettre à jour régulièrement, au gré des améliorations technologiques et des avancées de la recherche scientifique qui, compte tenu de l'importance croissante de l'analyse de l'ADN dans les études de biodiversité, sont susceptibles d'être nombreuses dans les années à venir.

Il est nécessaire de choisir des méthodes d'échantillonnage et d'analyse respectant les plus hauts niveaux de précaution possibles.



Flabellina affinis © Laurent Ballesta, Andromède Océanologie

Perspectives

→ PERSPECTIVES TECHNIQUES

• DÉTECTER DE NOUVEAUX TAXONS

Les analyses de l'ADNe présentent l'avantage de pouvoir identifier un large panel d'organismes, allant des bactéries aux grands mammifères en passant par les plantes. Ces approches novatrices offrent ainsi de nouvelles perspectives d'application pour les groupes taxonomiques jusqu'à présent sous-représentés voire ignorés par les méthodes d'inventaire traditionnelles. Cependant, la littérature révèle des disparités dans les taxons ciblés par les techniques de biologie moléculaire en milieu marin. En effet, si certains groupes tels que les poissons et les mammifères sont bien étudiés, d'autres organismes essentiels comme les coraux et les algues sont, en revanche, moins communément pris en compte¹⁴. Le développement de nouvelles méthodes d'échantillonnage conjugué à l'élaboration de nouvelles amorces et de bases de références génétiques plus adaptées à ces espèces, pourrait fournir des données complémentaires essentielles pour une meilleure compréhension de la biodiversité et du fonctionnement des écosystèmes.

• OBTENIR DES DONNÉES QUANTITATIVES

Bien que l'analyse de l'ADNe ne soit pas adaptée pour caractériser l'état des populations ou pour fournir des informations individuelles, elle offre, en revanche, des perspectives intéressantes pour l'estimation de la biomasse des espèces. En effet, étant donné la corrélation positive entre les quantités d'ADNe et l'abondance des espèces présentes dans l'environnement²⁹, les méthodes basées sur cette analyse permettent de déterminer l'abondance relative des organismes. Cependant, une étude récente menée sur des populations piscicoles propose, en utilisant les mêmes amorces, de combiner le metabarcoding et la quantification de l'ADNe total récolté. Les résultats obtenus suggèrent que cette approche pourrait permettre une estimation approximative de l'abondance absolue des poissons³⁰.

• EXPLORER DE NOUVEAUX MILIEUX

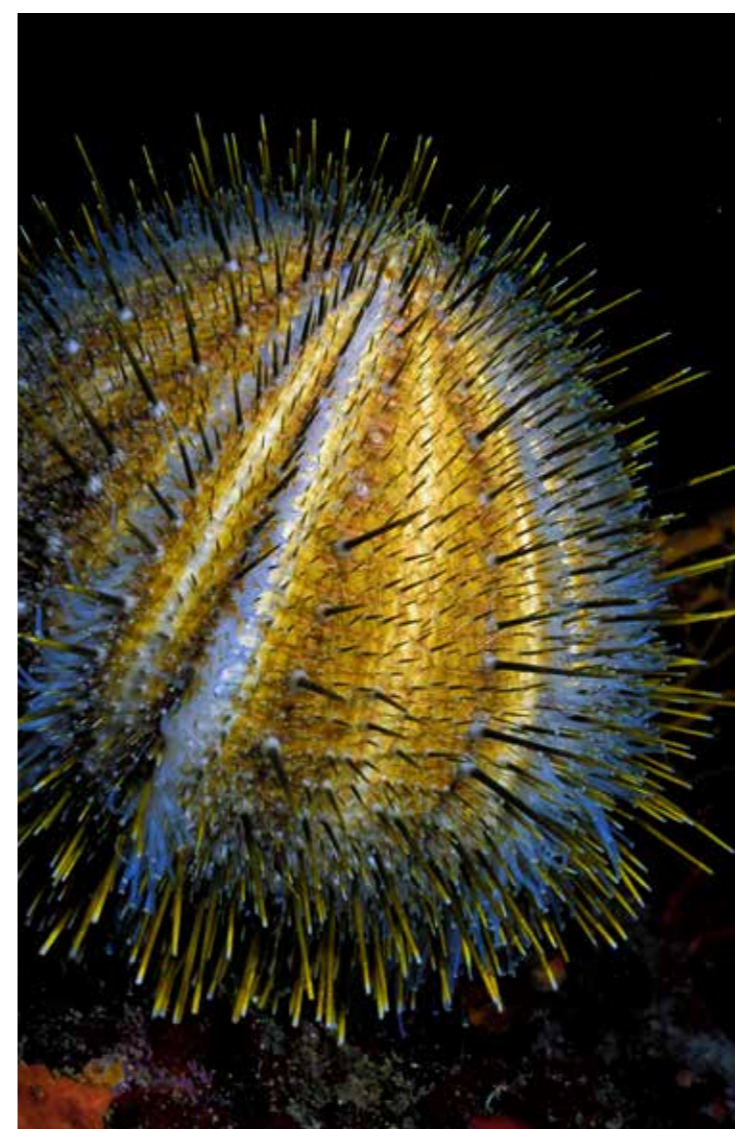
De nouvelles méthodes d'échantillonnage réalisées par des robots autonomes sous-marins (AUV pour Autonomous Underwater Vehicle) sont actuellement testées par les partenaires Vigilife. Ces perspectives technologiques pourraient appuyer le changement d'échelle permis par les analyses de l'ADNe dans l'étude de la biodiversité, tant au niveau spatial que temporel.

• ANALYSER L'ARN ENVIRONNEMENTAL

Au-delà de l'ADN environnemental, l'ARN (Acide RiboNucléique) environnemental (ARNe) est aujourd'hui de plus en plus considéré pour les analyses de biodiversité. L'analyse des molécules d'ARN présentes dans les écosystèmes offre des perspectives intéressantes pour le développement de marqueurs génétiques fonctionnels et pour l'évaluation des risques de biosécurité (par exemple, pour la détection de pathogènes)^{31, 32}. Cependant, l'ARN est plus rapidement dégradé et a une durée de vie réduite dans l'environnement par rapport à l'ADN, ce qui implique des contraintes supplémentaires en termes de conservation et d'analyse des échantillons (respect de la chaîne du froid, travail sur blocs de glace au laboratoire, etc.).

→ PERSPECTIVES D'APPLICATION

Les initiatives telles que BioDivMed et Aires Marines Sentinelles (Cf. chapitre 9) illustrent parfaitement le potentiel des analyses de l'ADNe pour mener des projets d'envergure au service de la biodiversité. Ce potentiel a été récemment renforcé par la présentation, en novembre dernier, de la stratégie nationale pour la biodiversité, qui prévoit la réalisation d'un grand inventaire à l'échelle nationale pour recenser la biodiversité du territoire en utilisant, notamment, l'analyse de l'ADNe.



Oursin melon © Laurent Ballesta, Andromède Océanologie

Paroles d'expert ↙

ADN environnemental et intelligence artificielle



Letizia Lamperti,
Doctrante à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

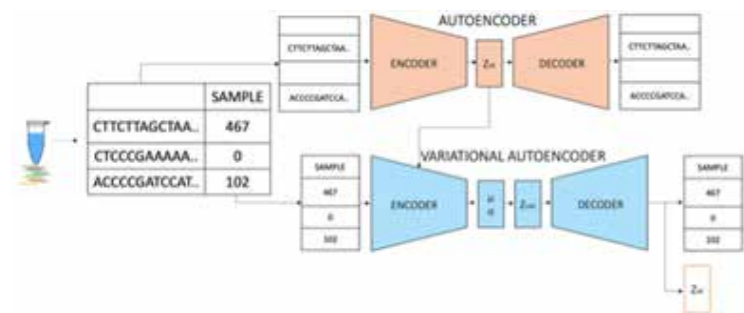


Figure 1.
Diagramme de la méthode VAE appliquées aux données issues d'ADNe

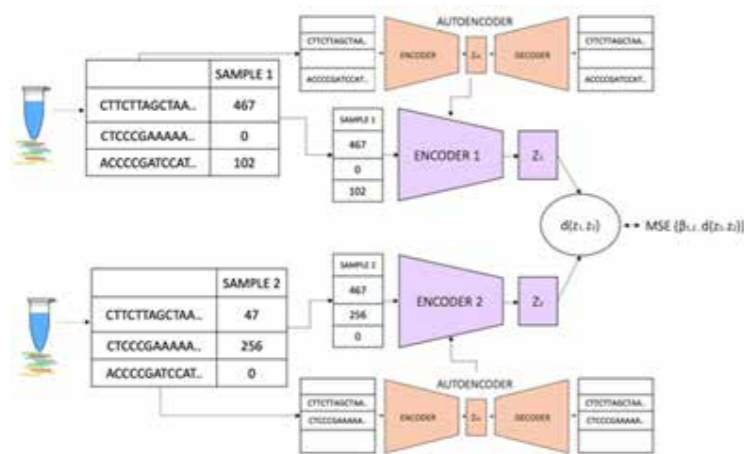


Figure 2.
Diagramme de la méthode DML appliquées aux données issues d'ADNe

L'ADN environnemental (ADNe) est devenu une ressource cruciale pour comprendre la biodiversité des écosystèmes marins et terrestres. Cependant, l'analyse de l'ADNe génère une quantité considérable de données complexes et multidimensionnelles, nécessitant une approche innovante pour en extraire des informations pertinentes. Dans ce contexte, l'intelligence artificielle (IA) joue un rôle essentiel en offrant des méthodes avancées pour analyser et interpréter les données issues d'ADNe.

Les réseaux de neurones profonds, une forme d'IA, ont émergé comme une solution prometteuse pour ordonner et visualiser les échantillons d'ADNe dans un espace réduit bidimensionnel. En combinant différentes architectures de réseaux neuronaux, ces méthodes permettent une représentation précise de divers indicateurs de biodiversité, améliorant ainsi l'interprétation écologique des données issues d'ADNe.

Le metabarcoding de l'ADNe offre une méthode efficace pour surveiller la biodiversité dans divers écosystèmes. Cette technique permet de récupérer et d'analyser l'ADN excrété naturellement par les organismes dans leur environnement, offrant ainsi des informations taxonomiques, fonctionnelles et phylogénétiques précieuses.

Cependant, le metabarcoding de l'ADNe produit une grande quantité de données de séquençage, nécessitant une réduction de dimensionnalité pour extraire des caractéristiques pertinentes. Les techniques traditionnelles de réduction de dimensionnalité, telles que l'Analyse en Composantes Principales (PCA), ne sont pas toujours adaptées à la complexité des données issues d'ADNe.

Pour répondre à cette problématique, nous avons développé deux nouvelles méthodes basées sur l'apprentissage profond qui combinent différents types de réseaux neuronaux pour ordonner les échantillons issues d'ADNe et visualiser les propriétés des écosystèmes dans un espace bidimensionnel. La force de nos nouvelles méthodes réside dans la combinaison de deux entrées : le nombre de séquences trouvées pour chaque unité taxonomique opérationnelle moléculaire (MOTU)* détectée et leur séquence nucléotidique correspondante.

En utilisant trois ensembles de données différents, nous montrons que nos méthodes représentent avec précision plusieurs indicateurs de biodiversité dans un espace latent bidimensionnel : la richesse des MOTU par échantillon, la diversité α des séquences par échantillon, la diversité β de Jaccard et de séquence entre les échantillons. Nous montrons que nos méthodes non linéaires sont meilleures pour extraire des caractéristiques des ensembles de données d'ADNe tout en évitant les principaux biais associés à l'ADNe. Nos méthodes surpassent les méthodes traditionnelles de réduction de dimension.

En utilisant l'IA, il est possible de surmonter les défis liés à l'analyse des données issues d'ADNe, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour comprendre et préserver la biodiversité des écosystèmes. Ces avancées permettent d'améliorer la capacité à surveiller les écosystèmes, à mieux comprendre leurs réponses aux perturbations environnementales et à concevoir des mesures de gestion et d'atténuation adaptées pour préserver la biodiversité.

*Regroupement de séquences selon un seuil de similarité



Pour en savoir plus : Lamperti et al. 2023. New deep learning-based methods for visualizing ecosystem properties using environmental DNA metabarcoding data. Molecular Ecology Resources. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13861>

Paroles d'expert ↙

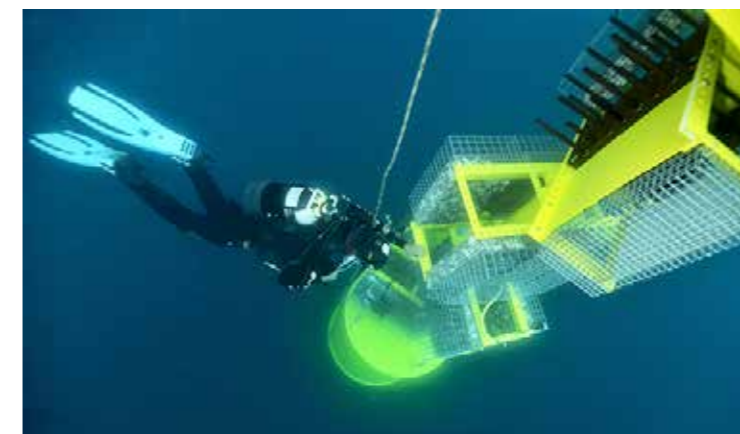
L'ADNe en milieu offshore, perspectives d'amélioration



Gilles Lecaillon,
Directeur général d'Ecocéan



Anaïs Gudefin
Responsable scientifique d'Ecocéan



Bouée BoB © Ecocéan



Bouée BoB © Ecocéan

Les connaissances concernant la vie du large, et notamment les espèces pouvant s'installer sur des structures offshore sont encore aujourd'hui limitées. Dans le cadre de projets de recherches et développement menés sur des bouées flottantes offshore (Bouées BoB et OCG-Data), respectivement installées à 15 et 30 km au large de Leucate sur des fonds de 80 à 100 mètres, nous avons donc utilisé l'ADNe en complément d'autres outils plus couramment utilisés jusqu'à présents, comme le suivi visuel ou le suivi par caméra. En effet, ces bouées étant moins faciles d'accès que des habitats côtiers, et le temps de plongée étant toujours limité, les caméras nécessitant à la fois un entretien technique et une certaine logistique pour être mises en œuvre, il était intéressant de compléter la liste des espèces présentes autour et sur la bouée avec une méthode d'échantillonnage relativement simple à mettre en œuvre.

Trois suivis ADNe ont été réalisés à différentes périodes sur les bouées (un sur BoB et deux sur OCG-Data), dans les premiers mètres d'eau. Ces suivis ont été réalisés conjointement avec l'Université de Montpellier et SPYGEN. Les résultats obtenus ont tous montré des listes d'espèces beaucoup plus importantes que n'importe quelle autre méthode de suivi, permettant ainsi comme espéré de compléter la liste d'espèces évoluant autour des bouées, notamment les espèces très mobiles comme les poissons pélagiques, difficilement observables en plongée.

Néanmoins, les résultats font également apparaître des espèces de fond, comme les uranoscopes ou les rougets de vase, ou des espèces côtières comme les castagnoles. S'il est possible que ces résultats soient issus du captage d'œufs ou de larves présentes dans la colonne d'eau, ils posent néanmoins la question de la calibration des échantillonnages en offshore. En effet, la question de la distance et de la profondeur de captage sur ces milieux ouverts et très brassés est trop importante pour pouvoir utiliser au mieux cet outil. De plus, certaines espèces présentes avec certitude sur les bouées comme des blennies, n'ont pas été détectées par l'ADNe. Pour pallier ce problème, la durée de filtration a été augmentée sur les échantillonnages suivants, permettant d'améliorer la capture de ces espèces plus cryptiques.

Il semble donc que, même si cette technique reste pertinente en complément des techniques de suivis plus traditionnelles, elle nécessite encore une évolution et une adaptation des protocoles mis en place en milieu offshore pour améliorer l'interprétation des résultats.



Bouée OCGdata © Ocergy

Glossaire

- **Adaptateur de séquençage** : Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées pour permettre leur fixation sur le support du séquenceur¹⁵.
- **ADN (Acide DésoxyriboNucléique)** : Molécule universelle et commune à tous les êtres vivants mais contenant l'information génétique propre à chaque individu.
- **ADN environnemental ou ADNe** : ADN pouvant être extrait à partir d'échantillons environnementaux tels que le sol, l'eau ou l'air, sans nécessiter d'isoler, au préalable, les organismes ciblés⁴.
- **Analyses bioinformatiques** : Ensemble d'analyses informatiques réalisées à partir des données de séquençage issues de l'analyse de l'ADNe extrait des échantillons considérés.
- **Amorce** : Courtes séquences synthétiques d'ADN permettant de cibler un marqueur génétique et d'initier son amplification par PCR (ou autres méthodes dérivées).
- **Amplicon** : Fragment d'ADN amplifié par PCR (ou autres méthodes dérivées).
- **Approche spécifique** : Détection de la présence d'une espèce d'intérêt par détection d'une séquence précise de son ADN.
- **Approche multispécifique (ou metabarcoding)** : Détection simultanée et sans *a priori* de plusieurs espèces différentes appartenant à un même groupe taxonomique⁴.
- **ASV (Amplicon Sequence Variant)** : Variant de séquence d'amplicon consistant en un regroupement d'une séquence principale avec plusieurs autres séquences proches, moins abondantes et considérées comme des erreurs de la séquence principale.
- **AUV (Autonomous Underwater Vehicle)** : Robot autonome sous marin.
- **Base de références génétiques** : Banques de séquences d'ADN d'espèces connues.
- **Capsule de filtration** : Capsule renfermant une membrane filtrante.
- **Contamination** : Procédé par lequel de l'ADN exogène est introduit dans un échantillon.
- **Contrôle** : Échantillon dont le matériel génétique est absent ou connu. Un contrôle négatif est un échantillon sans matériel génétique, utilisé pour vérifier que l'analyse est exempte de contamination. Un contrôle positif est un échantillon contenant un matériel génétique connu, utilisé pour vérifier que l'étape de l'analyse (extraction ou amplification) s'est déroulée correctement.
- **Décontamination** : Ensemble des étapes nécessaire pour enlever/nettoyer les traces d'ADN sur le matériel d'échantillonnage ou sur toutes les surfaces pouvant entrer en contact avec l'échantillon sur le terrain ou au laboratoire.
- **Extraction ADN** : Étape permettant d'isoler l'ADNe contenu dans les échantillons environnementaux.
- **Faux-négatif** : Absence de détection d'une espèce présente dans l'environnement étudié.
- **Faux-positif** : Détection d'une espèce absente de l'environnement étudié.
- **Index** : Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque librairie de séquençage¹⁵.
- **Librairie de séquençage** : Ensemble des amplicons (séquences d'intérêt amplifiées) à séquencer et comportant à leurs extrémités des tags, des adaptateurs de séquençage et des index²⁶.
- **Marqueur génétique (ou code-barre génétique)** : Région spécifique et connue de l'ADN ayant une localisation précise dans le génome (par exemple, un gène ou une partie d'un gène).
- **OTU (Operational Taxonomic Unit)** : Unité taxonomique opérationnelle consistant en un regroupement de séquences identiques entre elles jusqu'à un certain seuil. Le terme MOTU (Molecular Operational Taxonomic Unit) peut également être rencontré.
- **PCR (Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne)** : Méthode d'amplification d'un fragment spécifique d'ADN permettant d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.
- **PCR digitale (dPCR)** : Méthode dérivée de la PCR quantitative, où le mélange réactionnel est fractionné en milliers de microréactions.
- **PCR quantitative (qPCR)** : Méthode dérivée de la PCR se basant sur la mesure d'un signal fluorescent émis lors de l'amplification du fragment d'ADN ciblé.
- **Profondeur de séquençage** : nombre total de séquences lues attendues par échantillon.
- **Réplicas** : Échantillons prélevés sur un même site d'étude ou générés dans des conditions expérimentales identiques.
- **Reads** : Lecture d'une séquence par le séquenceur.
- **Stratégie d'échantillonnage** : Planification de la collecte des échantillons permettant de déterminer le nombre d'échantillons à collecter, leur répartition spatio-temporelle ainsi que les méthodes et les réglementations à respecter.
- **Séquençage** : Détermination de la séquence constituant un fragment d'ADN.
- **Séquence** : Succession de nucléotides.
- **Tag** : Courtes séquences synthétiques d'ADN ajoutées aux séquences d'intérêt amplifiées et consistant en un identifiant unique pour chaque échantillon ou chaque réplica PCR²⁶.
- **UVC (Underwater Visual Census)** : Recensement visuel sous-marin réalisé par des plongeurs.

Bibliographie

1. Ogram *et al.* 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
2. Ficetola *et al.* 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
3. Pawlowski *et al.* 2020. Utilisations de l'ADN environnemental pour la surveillance et l'évaluation biologiques des écosystèmes aquatiques. <https://doi.org/10.5167/uzh-187800>
4. Taberlet *et al.* 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
5. Pawlowski *et al.* 2020. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>
6. Stewart. 2019. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01709-8>
7. Barnes & Turner. 2015. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
8. Marques. 2020. Nécessité, potentiel et limitations de l'approche en Unités Taxonomiques Moléculaires pour analyser la biodiversité de l'ADN environnemental des poissons. <https://ged.biu-montpellier.fr/florabium/jsp/nnt.jsp?nnt=2020MONTG039>
9. Canals *et al.* 2021. Vertical stratification of environmental DNA in the open ocean captures ecological patterns and behavior of deep-sea fishes. *Limnology and Oceanography Letters*. <https://doi.org/10.1002/lol2.10213>
10. Harrison *et al.* 2019. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>
11. Murakami *et al.* 2019. Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1282-6>
12. Collins *et al.* 2018. Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>
13. Scriver *et al.* 2023. Harnessing decay rates for coastal marine biosecurity applications: A review of environmental DNA and RNA fate. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.405>
14. Takahashi *et al.* 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>
15. Bruce *et al.* 2021. A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment. *Pensoft*. <https://doi.org/10.3897/ab.e68634>
16. McClenaghan *et al.* 2020. Harnessing the power of eDNA metabarcoding for the detection of deep-sea fishes. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236540>
17. Bessey *et al.* 2020. Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.74>
18. Deter *et al.* 2023. 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. https://medtrix.fr/wp-content/uploads/2023/04/eREF-rapport2023_VF.pdf
19. Ali *et al.* 2017. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *Biomed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
20. Purcell *et al.* 2016. Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep34554>
21. Ficetola *et al.* 2015. Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12338>
22. Biggs *et al.* 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>
23. Herder *et al.* 2014. Environmental DNA a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.4002.1208>
24. Thaling *et al.* 2021. A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.189>
25. Taberlet *et al.* 2018. Environmental DNA : For biodiversity research and monitoring. Oxford University PressOxford. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>
26. Bohman *et al.* 2021. Strategies for sample labelling and library preparation in DNA metabarcoding studies. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13512>
27. Piper *et al.* 2019. Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *Gigascience*. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz092>
28. Antich *et al.* 2021. To denoise or to cluster, that is not the question: optimizing pipelines for COI metabarcoding and metaphylogeography. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04115-6>
29. Rourke *et al.* 2022. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>
30. Pont *et al.* 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>
31. Cristescu. 2019. Can Environmental RNA Revolutionize Biodiversity Science? *Trends in Ecology & Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.05.003>
32. Miyata *et al.* 2022. Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis of river algae and arthropods for ecological surveys and water quality assessment. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23888-1>

