

AIDE A L'INTERPRETATION DETECTION DES AMPHIBIENS PAR L'ADNe



ÉTAT : DÉCEMBRE 2018

Sommaire

1. Bureaux accrédités 2019	2
2. Contacts	2
3. Introduction	3
4. Comment détecter une espèce dans un plan d'eau ?	3
5. Qu'est-ce qu'une présence confirmée ?	4
6. Limites de la méthode	4
7. Exemple de résultats d'analyse d'ADNe	6

Proposition de citation : Microsynth et al. (État : Décembre 2018). Aide à l'interprétation détection des amphibiens par l'ADNe.

1. Bureaux accrédités 2019

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG	Herisau, Salzburg
IC Infraconsult AG	Berne
Info fauna - karch	Neuchâtel
Kaden & Partner AG	Frauenfeld
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer	Ottenbach
Quadra GmbH	Zurich
UMG Umweltbüro Grabher	Bregenz (A)

2. Contacts

Informations générales :

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG
Kasernenstrasse 37
9100 Herisau
assistenz@arnal.ch (objet : ADNe)
071 366 00 50

Informations sur les travaux de laboratoire :

Ecogenics GmbH
Christoph Grünig | eDNA
Schützenstrasse 15
9436 Balgach
info@ecogenics.ch

3. Introduction

L'ADN environnemental (ADNe) a certes gagné en popularité au cours des dernières années, mais cela reste une méthode nouvelle et seuls quelques utilisateurs et utilisatrices ont déjà quelque expérience pratique en la matière. Le but de la présente aide à l'interprétation est donc d'expliquer comment il faut interpréter les données d'analyse du laboratoire.

Le champ d'application de la présente aide à l'interprétation est limité à l'interprétation des résultats des analyses d'ADNe. L'interprétation de ces résultats aux fins de la biologie de la protection de la nature dépend quant à elle de la problématique de départ et des données collectées.

- Exemple N° 1 : si l'on a mélangé les échantillons provenant de plusieurs plans d'eau d'un site de reproduction des batraciens, on obtiendra une réponse pour le site de reproduction dans sa globalité. En revanche, si l'on a fait analyser séparément des prélèvements de chaque plan d'eau du site de reproduction, on obtiendra des réponses distinctes pour chaque plan d'eau.
- Exemple N° 2 : si l'on prélève les échantillons en mars, certaines espèces « tardives » comme le sonneur à ventre jaune ou la rainette verte ne sont pas encore actives et ne pourront donc pas faire l'objet d'un recensement (et ce indépendamment de la méthode choisie). Le résultat « présence non confirmée » devra alors être interprété en conséquence, ce que seule la personne qui a commandé les analyses est en mesure de le faire.

Pour de plus amples informations sur la méthodologie de l'ADNe, nous renvoyons les lecteurs à ces deux articles en langue allemande :

- Schmidt, B.R., Grünig, C.R. 2017. Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring. - WSL-Berichte (Forum des Wissens) 60: 57-62.
- Schmidt, B.R., Ursenbacher, S. 2015. Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern. - Zeitschrift für Feldherpetologie 22: 1-10.

Pour une introduction générale à la théorie de la détection des espèces, nous renvoyons aux travaux suivants :

- Kéry, M. 2008. Grundlagen der Bestandserfassung am Beispiel von Vorkommen und Verbreitung. – Der Ornithologische Beobachter 105: 353-386.

4. Comment détecter une espèce dans un plan d'eau ?

Pour détecter une espèce dans un plan d'eau à l'aide de l'ADNe, il faut généralement faire analyser plusieurs échantillons d'eau prélevés à différents moments. Comme pour une cartographie classique, il faut se rendre plusieurs fois sur le site de reproduction des batraciens examiné. La même règle bien connue de tous les naturalistes vaut donc aussi bien pour le travail de cartographie que pour l'ADNe : les espèces ne se trouvent pas toutes partout en même

temps. C'est dans l'ordre des choses et ce n'est pas une particularité propre à la recherche par ADNe. Cela peut toutefois avoir pour conséquence que l'on pourra détecter une espèce dans un, deux ou trois échantillons d'eau, voire dans aucun. C'est pourquoi nous proposons d'appliquer la règle « trouvé c'est trouvé » : si une espèce est détectée dans un prélèvement, sa présence est réputée confirmée.

5. Qu'est-ce qu'une présence confirmée ?

Le laboratoire mesure la quantité d'ADN des espèces contenue dans l'échantillon d'eau. Dans le jargon, on parle du nombre de « reads ». Ce nombre peut fortement varier, surtout en fonction de la qualité de l'échantillon d'eau (quantité d'ADNe, type de plan d'eau, stockage après le prélèvement, etc.). Nous avons donc développé une formule (algorithme) qui permet de classer les espèces dans trois catégories selon le nombre de « reads » (voir exemple pratique au chiffre 7) : 0 = présence non confirmée, 1 = présence sous réserve et 2 = présence confirmée. La catégorie 2 caractérise une espèce dont la présence est réputée confirmée. Tel est aussi le cas lorsque la présence est confirmée dans un seul des trois échantillons. Ainsi, en cas de présence sous réserve et de présence confirmée d'une espèce dans les différents échantillons, la présence de l'espèce est réputée confirmée.

Lorsque la présence d'une espèce est caractérisée uniquement par des 1, la présence n'est confirmée que sous réserve ; il convient alors de retourner sur le terrain (pour une analyse d'ADNe ou une méthode conventionnelle), en fonction de la problématique étudiée. Exemple N° 1 : si la détection d'espèces s'inscrit dans un projet de conservation des espèces, on peut prendre la décision de n'adopter des mesures de conservation que là où la présence de l'espèce est confirmée. Exemple N° 2 : si la détection d'espèces est effectuée dans le cadre d'une étude d'impact sur l'environnement, il faut déterminer si une espèce est présente ou pas (p. ex. en vue de mesures de remplacement selon la LPN). La présence effective de l'espèce doit donc être confirmée.

6. Limites de la méthode

Toute méthode de détection des espèces a ses limites et l'ADNe ne fait pas exception.

- Il est possible qu'une espèce ne soit pas détectée en dépit de plusieurs prélèvements. Si l'on obtient trois fois le résultat 0, cela ne veut pas dire que l'espèce n'est pas présente dans le site de reproduction des batraciens. Trois 0 signifient que l'espèce n'a pas été identifiée (et cela vaut non seulement pour l'ADNe mais pour toutes les méthodes de recensement des espèces). La probabilité qu'une espèce ne soit pas identifiée peut être estimée grossièrement sur la base des résultats. Admettons qu'une espèce soit identifiée dans deux échantillons d'eau sur trois. Quelle est la probabilité que cette espèce ne se trouve pas dans trois échantillons ? Si les trois

échantillons sont prélevés au même endroit et au même moment, soit l'espèce est présente soit elle n'est pas présente. Il en découle qu'il y a une chance sur trois pour que l'on n'identifie pas une espèce dans un échantillon d'eau. Les chances après trois visites (prélèvements) sont de $(1 - (1/3))^3 = 0,29$ (pour le développement, voir les travaux de Kéry 2008). On peut ainsi estimer que l'espèce ne sera pas identifiée dans 29 % de plans d'eau où elle est pourtant présente.

- Les quantités d'ADNe dans l'eau diminuent rapidement lorsqu'une espèce quitte les lieux. L'ADNe reste détectable dans l'eau pendant environ deux semaines. On ne peut donc détecter la présence d'une espèce dans un plan d'eau que si elle s'y trouve au moment des prélèvements ou si elle l'a quitté récemment. À l'inverse, la concentration d'ADNe augmente rapidement lorsqu'une espèce arrive dans un plan d'eau. Cela signifie, d'une part, que si une présence est détectée, l'espèce se trouvait dans le plan d'eau au moment du prélèvement des échantillons et, d'autre part, que ce type d'observation nécessite le prélèvement des échantillons pendant la période d'activité des espèces visées. Si l'on effectue les prélèvements en juin, il se peut que la présence de la grenouille rousse ne soit plus détectable. Inversement, s'ils sont effectués début avril, il est probable que l'on ne trouvera ni crapaud sonneur ni rainette verte.
- L'ADNe prouve la présence des espèces dans l'eau. Cela veut donc dire que cette méthode ne permet pas de détecter facilement les espèces qui séjournent peu dans l'eau, comme la rainette verte dont les individus adultes ne vont dans l'eau que pour chanter et s'accoupler. Les concentrations d'ADNe restent alors faibles. La présence de la rainette verte, mais également du crapaud calamite, se détecte mieux à l'aide de l'ADNe dès qu'il y a des têtards dans l'eau.
- La probabilité de détecter une espèce au moyen de l'ADNe devrait également dépendre de la taille de la population, mais il n'existe encore aucune étude scientifique sur ce sujet. Cela veut dire qu'il sera plus difficile de détecter les petites populations que les grandes.
- Un amphibien libère de l'ADN dans l'eau et celui-ci se diffuse ensuite dans le plan d'eau sous forme d'ADNe. Ce processus de diffusion, qui n'a pas encore fait l'objet d'études, ne joue vraisemblablement aucun rôle dans la plupart des types de plans d'eau. Il se peut toutefois que, dans les points d'eau situés dans les bas-marais ou dans les plans d'eau étendus et peu profonds, la diffusion de l'ADNe soit très lente et que la présence d'espèces soit donc difficile à détecter. Il convient donc d'en tenir compte lors des prélèvements sur le terrain. En d'autres termes, il ne faut prélever des échantillons que là où l'on doit s'attendre à trouver des individus adultes.

7. Exemple de résultats d'analyse d'ADNe

Nous montrons ci-dessous, à l'aide d'un exemple, comment les résultats des analyses d'ADNe sont communiquées au mandant.

Tableau 1: Exemple de résultats d'une analyse d'ADNe pour la détection d'amphibiens. Voir les commentaires ci-contre au sujet des notes 1 à 5.

		1						
		110301	110302	110303	110304	110305	110306	110307
Ordre	Espèce	Échantillon_01	Échantillon_02	Échantillon_03	Échantillon_04	Échantillon_05	Échantillon_06	Échantillon_07
Anura	Alytes_obstetricans	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bombina_bombina	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bombina_variegata	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bufo_bufo	0	0	2	2	2	0	0
Anura	Epidalea_calamita	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Hyla_arborea	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Hyla_intermedia	0	0	0	0	0	0	0
2	Anura	Pelophylax_bedrigae	0	0	0	0	0	0
Anura	Pelophylax_bergeri	0	0	0	3	0	0	2
Anura	Pelophylax_esculentus_lessonae	0	0	0	0	0	0	1
Anura	Pelophylax_kurtmuelleri_ridibundus_complex	2	0	0	0	0	0	0
Anura	Rana_dalmatina	2	2	2	0	0	0	1
Anura	Rana_latastei	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Rana_temporaria	2	2	2	2	2	2	1
Caudata	Ichthyosaura_alpestris	0	0	1	2	1	0	0
Caudata	Lissotriton_helveticus	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Lissotriton_vulgaris	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Salamandra_salamandra	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Triturus_carnifex	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Triturus_cristatus	0	0	0	0	0	0	0
4	Concentration d'ADN d'amphibiens	élevée	élevée	élevée	moyenne	faible	moyenne	faible
5	Autres espèces identifiées							
Anseriformes	Anas_platyrhynchos	0	2	0	0	0	0	0
Galliformes	Gallus_gallus	1	2	0	0	2	2	1
Passeriformes	Turdus_merula	2	0	0	0	0	0	0
Primates	Homo_sapiens	0	0	0	0	1	2	0
Salmoniformes	Salmo_salar	0	0	2	1	2	2	0

1

À chaque échantillon d'ADNe correspond une colonne. Le libellé de l'échantillon se compose du numéro à code-barres et du nom de l'échantillon, s'il a été indiqué dans le formulaire de commande (Sampling Submission Form).

2

Toutes les espèces d'amphibiens qui peuvent être détectées selon le procédé de « barcoding » sont énumérées dans le premier bloc. Si certaines espèces ne peuvent pas être différenciées, toutes les espèces du groupe sont présentées ensemble (p. ex. *Pelophylax esculentus* et *Pelophylax lessonae*). La différence du séquençage ADN des groupes *Pelophylax bergeri* et *Pelophylax esculentus lessonae* est particulièrement faible. C'est la raison pour laquelle ces deux unités taxonomiques doivent être interprétées avec la plus grande prudence. Par contre, les autres espèces et groupes d'espèces du genre *Pelophylax* peuvent être différenciées facilement. Lorsque la présence d'une espèce n'est pas attestée, cela est indiqué par un 0.

3

La présence d'une espèce est indiquée sur une échelle de trois. Le chiffre 2 signifie que la présence de l'espèce est confirmée dans l'échantillon. En revanche, le chiffre 1 indique que la présence est confirmée, mais à la limite de détection ; si la confirmation de la présence de l'espèce est importante pour la problématique du mandant, il convient donc de vérifier les résultats.

4

La quantité d'ADN d'amphibiens contenue dans un échantillon d'eau peut avoir une influence sur la confirmation de la présence d'amphibiens. Lorsque la concentration d'ADN d'amphibiens est très faible, la détection de la présence d'amphibiens peut donc devenir très aléatoire. La valeur indiquée ici est basée, d'une part, sur le nombre de « reads » générés pour l'échantillon considéré et, d'autre part, sur la présence d'ADN synthétique comportant un nombre connu et très faible de molécules, qui est ajouté à chaque échantillon. Les résultats des échantillons contenant de faibles concentrations d'ADN d'amphibiens doivent être interprétés avec prudence.

5

D'autres espèces sont détectées en plus des amphibiens. Leur classement taxonomique est toutefois moins précis que pour les amphibiens et ces données ne sont qu'un indicateur de la présence d'une espèce ou d'un genre. Il ne faut par exemple pas s'attendre à ce que le saumon (*Salmo salar*) soit présent dans les sites de reproduction des batraciens. Mais il se peut que l'on trouve de l'ADNe d'espèces de poissons voisines (comme la truite).