

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



ÉTAT : AVRIL 2024

Sommaire

Bureaux accrédités 2024	2
Contacts	2
1. Introduction	3
2. Présence des espèces dans l’eau	4
3. Qu’est-ce qu’une présence confirmée ?	4
4. Limites de la méthode	5
5. Exemple de résultats d’analyse d’ADNe	7

Proposition de citation : Microsynth et al. (état : avril 2024). Aide à l’interprétation – Détection des amphibiens par l’Adn.

Bureaux accrédités 2024

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG
Info fauna karch
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer

Herisau, Salzburg
Neuchâtel
Ottenbach

Contacts

Informations générales :	Informations sur les travaux de laboratoire :
ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG Kasernenstrasse 37 9100 Herisau assistentz@arnal.ch (objet : ADNe) 071 366 00 50	Ecogenics GmbH / Microsynth AG Schützenstrasse 15 9436 Balgach myproject@microsynth.ch

1. Introduction

L'ADN environnemental (ADNe) a certes gagné en popularité au cours des dernières années, mais cela reste une méthode nouvelle dans ses applications pratiques. La planification d'un recensement par ADNe ainsi que le déroulement du travail sur le terrain sont décrits dans la « Méthodologie ADNe Amphibiens – Prélèvements sur le terrain » (ARNAL et al., février). Le présent document complète cette méthodologie en expliquant comment interpréter les résultats du laboratoire. L'interprétation de ces résultats dans l'optique de la biologie de la conservation n'est pas abordée ici.

La bibliographie suivante permettra d'approfondir les questions relatives à la génétique de la conservation et à l'ADNe :

- Holderegger, R., Schmidt, B.R., Grünig, C., Meier, R., Csencsics, D., Gassner, M., Rellstab, C., & Stapfer, A. (2020) Ready-to-use workflows for the implementation of genetic tools in conservation management. *Conservation Genet Resour* **12**, 691–700.
- Holderegger, R., Stapfer, A., Schmidt, B., Grünig, C., Meier, R., Csencsics, D., Gassner, M. (2019). Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund. WSL Berichte 81. 56 p.
- Schmidt, B.R., Grünig, C.R. 2017. Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring *in* Naturschutzgenetik, WSL Berichte 60. pp. 57-62.
- Schmidt, B.R., Ursenbacher, S. 2015. Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern *in* Zeitschrift für Feldherpetologie 22. pp. 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 *in* Der Ornithologische Beobachter 105. pp. 353-386.

2. Présence des espèces dans l'eau

Pour déterminer la présence d'une ou plusieurs espèces par ADNe dans l'eau, il faut recueillir un ou plusieurs échantillons d'eau que l'on fera analyser par un laboratoire. En règle générale, il faut faire analyser trois échantillons de laboratoire. La présence (ou non) des espèces est recherchée pour chaque échantillon. Il se peut ainsi qu'une espèce ne soit détectée dans aucun des échantillons de laboratoire, ou seulement dans un, voire dans deux ou même dans les trois. Il suffit qu'il y ait de l'ADN dans un échantillon d'eau pour que la présence d'une espèce puisse être attestée, voire confirmée.

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

Le laboratoire mesure la quantité d'ADN des espèces contenue dans l'échantillon d'eau. Cela débouche sur un nombre déterminé de *reads*, un *read* étant un tronçon d'ADN de l'espèce recherchée (p. ex. 500 *reads* pour la grenouille rousse). Le nombre de *reads* peut fortement varier d'un échantillon à l'autre, en fonction de la qualité de l'échantillon d'eau (quantité d'ADNe, type de plan d'eau, stockage après le prélèvement, etc.).

Une formule (algorithme) a été développée pour classer les espèces dans trois catégories de présence en fonction du nombre de *reads* d'un échantillon (voir l'exemple pratique au chap. 5) :

- 0 = aucune présence
- 1 = présence incertaine
- 2 = présence probable

La présence d'espèces doit être analysée dans les trois échantillons prélevés afin de relativiser le risque de « faux positifs ». La probabilité d'une présence peut être résumée sous forme tabulaire (cf. Tableau 1).

Tableau 1 : Table d'évaluation après analyse des trois échantillons prélevés. Lorsque l'évaluation indique qu'il n'y a aucune présence ou une présence très incertaine d'espèces, la trame de la case est rouge ; elle est orange lorsque la présence est incertaine mais possible ; elle est verte lorsque la présence est confirmée.

Nombre d'échantillons avec catégorie de présence 1	Nombre d'échantillons avec catégorie de présence 2	Évaluation
0	0	aucune présence
1	0	aucune présence
0	1	présence improbable
2	0	présence incertaine
1	1	présence incertaine
0	2	présence confirmée
3	0	présence confirmée
2	1	présence confirmée
1	2	présence confirmée
0	3	présence confirmée

Lorsque l'évaluation des résultats des trois échantillons est signalée en vert dans le tableau, la présence d'espèces est confirmée. Tel est par exemple le cas lorsque les trois échantillons indiquent seulement une présence incertaine (catégorie 1).

Lorsque l'évaluation des trois échantillons est signalée en orange, la présence est incertaine et les résultats doivent être interprétés par un expert. Selon la problématique, il conviendra d'examiner si des relevés complémentaires sont nécessaires (ADNe ou relevés de terrain classiques) pour confirmer ou infirmer la présence incertaine.

4. 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 pour trois échantillons de laboratoire différents, 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 détectée (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. Par exemple, dans l'hypothèse où une espèce a été détectée dans deux échantillons de laboratoire sur trois, la probabilité que la présence ne soit pas attestée se calcule de la manière suivante : 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 détectée dans 29 % de plans d'eau où elle est pourtant présente.
- L'ADN présente dans l'eau se dégrade rapidement lorsqu'une espèce quitte le milieu. 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 et, par conséquent, la détection d'espèces qui séjournent peu dans l'eau peut être plus difficile avec cette méthode. Le crapaud accoucheur est un bon exemple. Cette espèce vit principalement sur la terre ferme, s'accouple également sur terre et dépose uniquement les œufs dans l'eau lorsqu'ils arrivent à maturité. Les concentrations d'ADNe restent donc

probablement faibles jusqu'à l'éclosion des larves, si tant est que l'on en trouve. La présence du crapaud accoucheur, mais également de la rainette verte, se détecte donc 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 devrait être 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. 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 qu'il soit donc difficile d'y détecter la présence d'espèces dans certains secteurs. 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 ou des larves.

5. 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 2 : 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						
		Échantillon_01	Échantillon_02	Échantillon_03	Échantillon_04	Échantillon_05	Échantillon_06	Échantillon_07
Ordre	Espèce	110301	110302	110303	110304	110305	110306	110307
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
Anura	Pelophylax_bedrigae	0	0	0	3	0	0	0
Anura	Pelophylax_bergeri	0	0	0	0	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
Concentration d'ADN d'amphibiens		élevée	élevée	élevée	moyenne	faible	moyenne	faible
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 (Sample 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.

3

La présence d'une espèce est indiquée sur une échelle de trois. Le chiffre 2 signifie que la présence de l'espèce est probable dans l'échantillon considéré. En revanche, le chiffre 1 indique que la présence est attestée, mais à la limite de détection, raison pour laquelle elle est considérée comme incertaine. Le chiffre 0 indique qu'aucune présence d'espèce n'est attestée. Pour interpréter la présence d'une espèce, les trois échantillons doivent être analysés.

Si la table d'évaluation signale une « présence incertaine » pour l'espèce recherchée et que cette dernière est importante pour la problématique du mandant, il faut effectuer une vérification.

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 une plus grande 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).