



---

Atouts et limites  
des méthodes génomiques  
- **barcoding, métabarcoding** et **ADNe** -  
dans les *suivis de biodiversité* :  
*regards d'un utilisateur*

Christophe BOUGET

---



Séminaire « Améliorer le suivi de la biodiversité des forêts métropolitaines :  
pourquoi, comment ? » MAA – 03/12/2019

# Identification taxinomique automatique à haut débit, une réponse à l'urgence ?

6<sup>e</sup> crise d'extinction majeure ?

**Handicap** taxinomique :

1. lacunes constatées dans les connaissances taxonomiques



1. e.g. Insectes Coléoptères :
  - a. 2 à 4 millions d'espèces estimées,
  - b. 400 000 espèces décrites (10-20%)
  - c. rythme de description = 2000 sp / an
  - d. Encore 800 à 1800 ans de travail !

2. **pénurie** croissante de taxinomistes et d'outils libres et ouverts

Pour la mise en place d'un paradigme **cybertaxonomique**  
(Godfray, 2007, *Tricentenaire Linné*)

# Des outils génomiques récents

## Méthodes de **détection** et **d'identification**

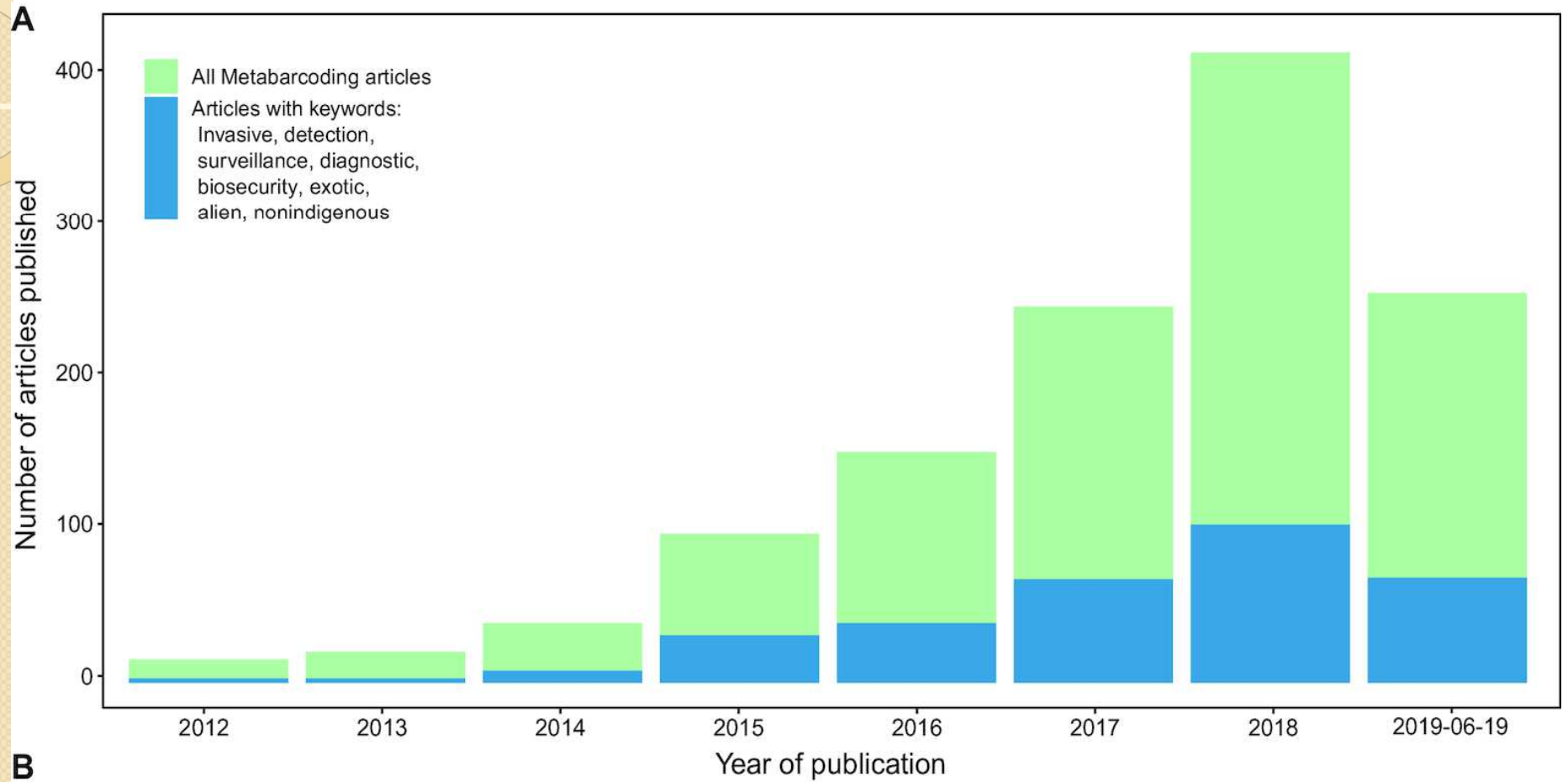
- fondées sur la **signature génomique** des espèces
- issues de la convergence **d'innovations technologiques** autour
  - des **séquenceurs** ADN rapides (NGS)
  - des **calculateurs** informatiques accessibles



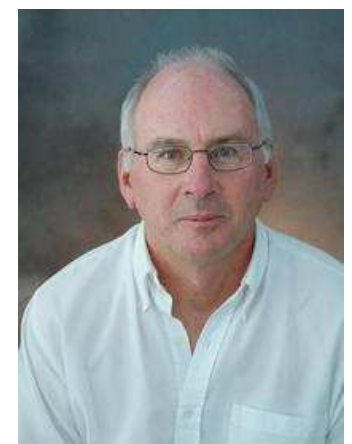
**Barcoding** (2003)

**Métabarcoding** (principe 2009, terme 2012)

# Des outils génomiques récents et **en plein essor**



# L'idée de départ du barcoding ADN



Paul Hebert  
Zoologiste, Université de Guelph (Canada)  
2003

## OBJECTIF

Utilisation d'un marqueur génétique **standard** et **discriminant** (séquence « code-barres » ADN) pour l'identification de l'espèce d'un spécimen

Choisir une région génomique **commune hypervariable** qui permet de discriminer chaque espèce par un seuil mini de distance entre les séquences (**barcode gap**), mais de variabilité intraspécifique très inférieure à la variabilité interspécifique

- ❖ Animaux :
  - ❖ Région de 658 pb du gène mitochondrial COI (Cytochrome oxydase I) (présent en multiples copies)
- ❖ Plantes :
  - ❖ gènes chloroplastiques rbcL (Ribulose-bisphosphate carboxylase) ou MatK (Maturase K)
- ❖ Champignons :
  - ❖ région ITS (Internal Transcribed Spacer Region)

2010  
Juin 2019

création à Guelph d'un consortium appelé **iBOL** (International Barcode of Life)  
7,3 millions de codes-barres ADN disponibles



# Le barcoding à l'échelle multi-spécifique



## Métabarcoding

- Caractérisation des espèces d'un assemblage multi-spécimens par séquençage à haut débit du marqueur des séquences d'ADN extraites simultanément de l'échantillon de départ
  - Séquençage non individuel mais collectif (« soupe d'ADN »)



RESEARCH Open Access

Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species

Melissa E. Carew<sup>1\*</sup>, Vincent J. Pettigrove<sup>1</sup>, Leon Metzeling<sup>2</sup> and Ary A. Hoffmann<sup>1,3</sup>



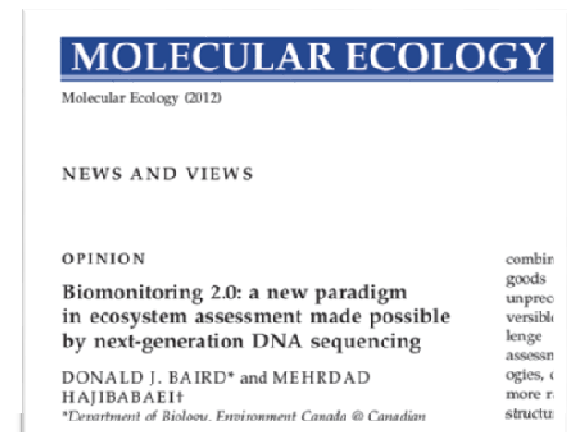
IDEA AND PERSPECTIVE Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding

Abstract To manage and conserve biodiversity, one must know what is being lost, where, and how. Remote sensing and other technologies are likely to be most effective. Metabarcoding technology can characterize the composition of environmental DNA. Here, we validate metabarcoding as a tool for monitoring biodiversity in a large-scale environmental monitoring program.

Methods in Ecology and Evolution doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x

Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring

Douglas W. Yu<sup>1,2\*†</sup>, Yinqiu Ji<sup>1†</sup>, Brent C. Emerson<sup>2,†</sup>, Xiaoyang Wang<sup>1</sup>, Chengxi Ye<sup>1</sup>, Chunyan Yang<sup>1</sup> and Zhaoli Ding<sup>3</sup>



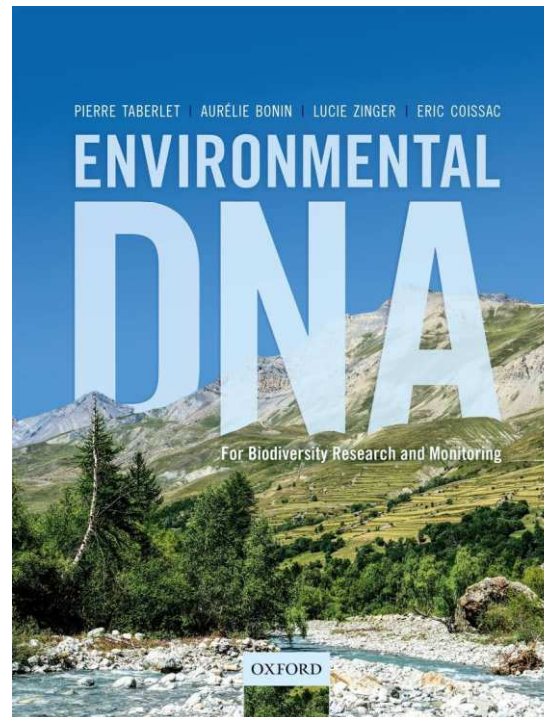
RESEARCH ARTICLE Species Identification in Malaise Trap Samples by DNA Barcoding Based on NGS Technologies and a Scoring Matrix Jérôme Morinère<sup>1\*</sup>, Bruno Cencian de Araujo<sup>1</sup>, Athena Wai Lam<sup>1</sup>, Axel Hauemann<sup>1,2</sup>, Michael Balke<sup>1,2</sup>, Stefan Schmidt<sup>1</sup>, Lars Hendrich<sup>1</sup>, Dieter Doezkal<sup>1</sup>, Berthold Färnmann<sup>3</sup>, Samuel Arvidsson<sup>2</sup>, Gerhard Haszprunar<sup>1,3</sup>

# Le barcoding à l'échelle multi-spécifique



## eDNA

- Caractérisation des espèces d'un échantillon environnemental (sol, eau, fleurs, bois...) dans lequel les espèces ont abandonné des fragments d'ADN séquençables, sans isolement préalable des organismes ciblés



## MOLECULAR ECOLOGY

Molecular Ecology (2012) 21, 2017–2030

doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05407.x

### Tracking earthworm communities from soil DNA

FRIEDERIKE BIENERT,\* SÉBASTIEN DE DANIELI,+ CHRISTIAN MIQUEL,\* ERIC COISSAC,\* CAROLE POILLOT,\* JEAN-JACQUES BRUN+ and PIERRE TABERLET\*

Received: 19 August 2018 | Revised: 5 November 2018 | Accepted: 19 November 2018

DOI: 10.1002/ece3.4809

ORIGINAL RESEARCH

WILEY Ecology and Evolution Open Access

### Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods

Philip Francis Thomsen | Eva E. Sigsgaard

# De l'échantillon aux espèces via l'ADN en 4 phases



1

2

3

4

Environmental  
sampling

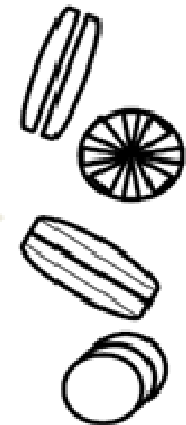
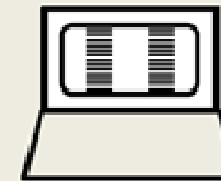
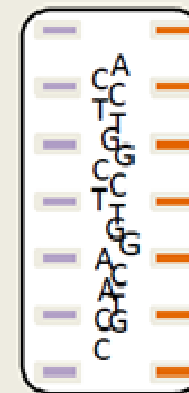
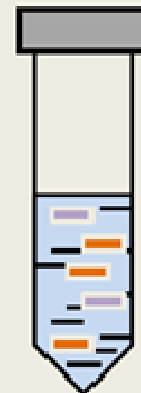
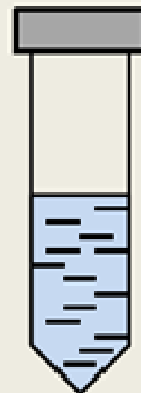
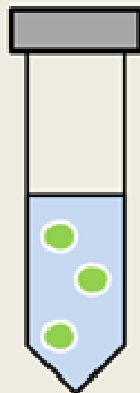
eDNA  
extraction

Group-specific  
primers

HTS

Bioinformatic  
processing

Species  
identification



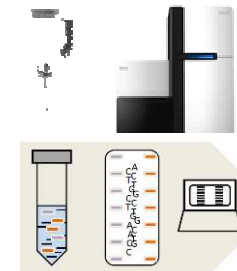


# Métabarcoding, eDNA: outils de biomonitoring 2.0 ?

Compatible avec logistique des suivis répétés à grande échelle  
avec lourd effort d'échantillonnage ?



**VS**





# Le métabarcoding en 10 atouts

# Les 10 **atouts** de la méthode pour l'identification et la numération des espèces

1. Recensement brut du nombre de **MOTUs**
2. Recensement des espèces grâce aux **bibliothèques** de barcodes de référence
3. Méthode opérationnelle pour des **non-spécialistes** en taxonomie
4. Valeur ajoutée du recensement de groupes **non-cibles**
5. Méthode **reproductible** (effet expert réduit)
6. Débit de traitement **rapide**
7. **Coûts** de fonctionnement faibles et en baisse
8. Opérations **automatisables** pro parte
9. Méthode opérationnelle avec **tout type** d'échantillon (larves, œufs, nymphes, fragments, traces)
10. Données connectables aux analyses (**phylo**)génétiques

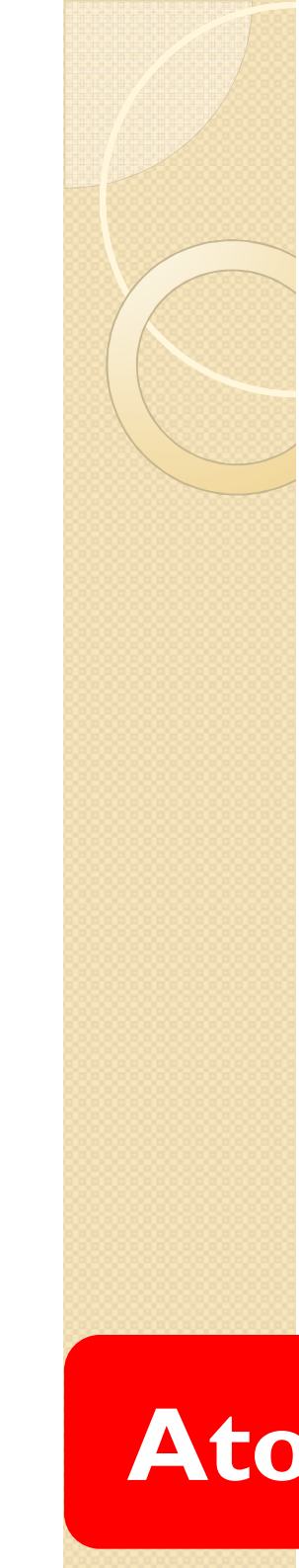
# Assignment des MOTUs (Unités Taxonomiques Opérationnelles Moléculaires) à des espèces connues

grâce à une bibliothèque de référence des barcodes ADN des espèces :

- centralisée (BOLD, mais aussi GENBANK),
- en ligne,
- d'implémentation dynamique
- d'accès public (communautaire),
- internationale (facilitant ainsi la détection des espèces invasives, cosmopolites, etc.)

**Atout 2**





## Méthode opérationnelle pour des non-spécialistes en taxinomie

...une fois la base de données de référence établie

Temps de mise en œuvre et  
débit de traitement  
rapides

**Atout 6**

## Coûts de fonctionnement

- faibles,
- en baisse,
- profitant d'offres de sous-traitance du séquençage par des acteurs économiques en plein essor
  - sociétés privées de biotechnologies, plateformes institutionnelles publiques mutualisées)

### Coût de traitement de l'échantillon

(de l'extraction au séquençage, excl. coût de travail non sous-traité)

**BARCODING** (2018) par spécimen (Illumina, plateforme MNHN)

4 € (dont 0.5€ de séquençage)

**MÉTABARCODING** (2016) par soupe d'ADN

20-37 € (à partir d'individus broyés)

18-27 € (à partir d'éthanol de stockage)

## Méthode opérationnelle

- avec peu de tissus (fragments d'insectes),
- pour tout stade de vie (larves œufs, nymphes)
- avec des traces ADN (eDNA)





# Le métabarcoding en 10 limites

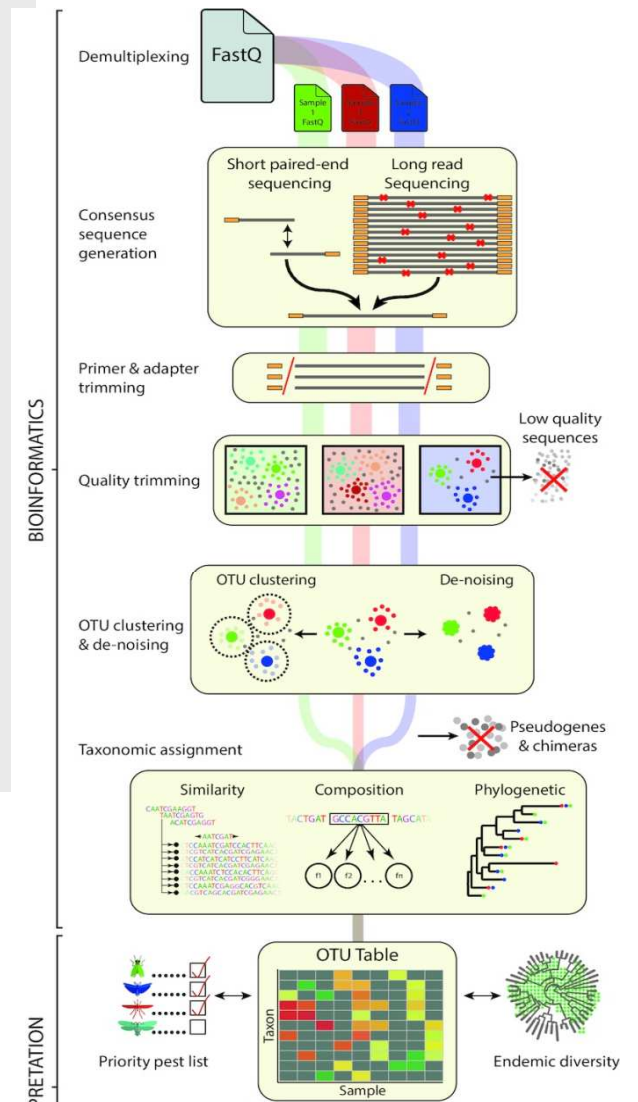
# Les 10 limites de la méthode pour l'identification et la numération des espèces

1. Besoins élevés en ressources **informatiques**
2. Besoins élevés en technologies **génomiques**
3. Phases du protocole difficiles à **sous-traiter**
4. Capacité d'identification par la méthode dépendante de **bibliothèque** de référence
5. **Variabilité** taxinomique de capacité discriminante du marqueur
6. Approche **quantitative** limitée
7. Risques de **contamination**
8. **Erreurs** inhérentes aux technologies de séquençage
9. Stochasticité d'amplification **PCR** de l'ADN initial
10. Immaturité des protocoles **non-destructifs**

# Besoins élevés en savoir-faire et ressources informatiques (= énergie...)

- chaîne complexe d'analyse des séquences :
  - post-traitement bioinformatique des séquences,
  - algorithmes d'assignation des MOTUs aux espèces par calculs de similarité (seuils 95%-98%)
- Stockage des données

Limite I



# Capacité d'identification par la méthode, dépendante de la bibliothèque des barcodes de référence :

- ❖ qualité
  - ❖ Erreurs de référencement d'espèces dans la bibliothèque
  - ❖ Groupes orphelins
- ❖ degré de complétude
  - ❖ taux de reconnaissance des séquences cibles



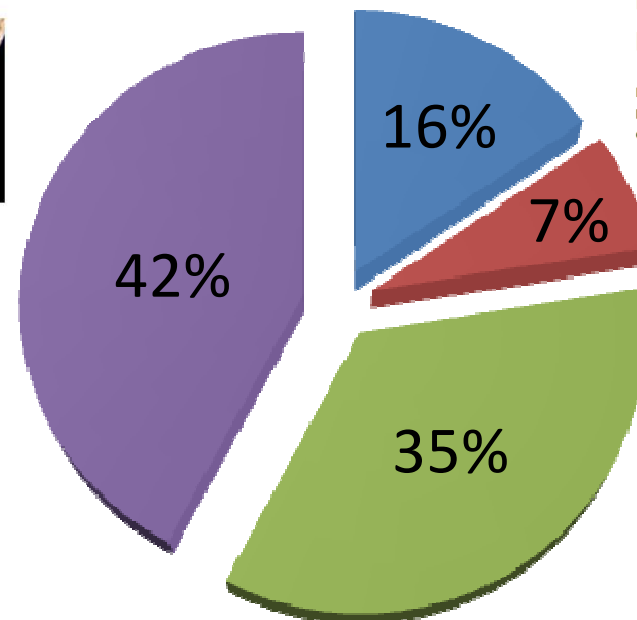
Data Paper

Les Coléoptères saproxyliques de France : Catalogue écologique illustré



Coordonné par : **Christophe BOUGET**, **Hervé BRUSTEL**, **Thierry NOBLECOURT** & **Pierre ZAGATTI**

Publié le 4 juillet 2019



## PASSIFOR: A reference library of DNA barcodes for French saproxylic beetles (Insecta, Coleoptera)

Rodolphe Rougerie<sup>\*,§</sup>, Carlos Lopez-Vaamonde<sup>§</sup>, Thomas Barnouin<sup>†</sup>, Julien Delnatte<sup>¶</sup>, Nicolas Moulin<sup>¶</sup>, Thierry Noblecourt<sup>†</sup>, Benoît Nusillard<sup>¶</sup>, Guillem Parmain<sup>¶</sup>, Fabien Soldati<sup>†</sup>, Christophe Bouget<sup>\*</sup>

- Rougerie et al. 2015
- Sire et al. 2019
- BOLD
- unbarcoded

2663 espèces, 72 familles

**Limite 4**

## Approche quantitative limitée

- ❖ Biais d'amplification PCR, variations du nombre de copies du gène cible
- ❖ Nombre d'individus ou biomasse non quantifiable
- ❖ Métriques de biodiversité restreintes

## Risques de contamination

- ❖ Écologique : ADN emboîté (proies dans le tube digestif des prédateurs...)
- ❖ Opérateur : protocoles ADN-proof, précautions de manipulation des échantillons, persistance temporelle ADN, témoins négatifs

## Immaturité des protocoles non destructifs

- ❑ Préservation des spécimens intègres pour rétrocontrôles ultérieurs (contrôle qualité)
  - ❑ e.g. Climtree Pyrénées
- ❑ Espèces douteuses et corrections
- ❑ Espèces nouvelles, découvertes taxinomiques ou biogéographiques



Original Articles

Metabarcoding of storage ethanol vs. conventional morphometric identification in relation to the use of stream macroinvertebrates as ecological indicators in forest management

Maitane Erdozain<sup>a,\*</sup>, Dean G. Thompson<sup>b</sup>, Teresita M. Porter<sup>b,c</sup>, Karen A. Kidd<sup>b,d</sup>, David P. Kreuzweiser<sup>b</sup>, Paul K. Sibley<sup>e</sup>, Tom Swystun<sup>b</sup>, Derek Chartrand<sup>b</sup>, Mehrdad Hajibabaei<sup>a,\*</sup>

Hajibabaei et al. *BMC Ecology* 2012, 12:28  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6785/12/28>



METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol

Mehrdad Hajibabaei<sup>a</sup>, Jennifer L. Spall, Shadi Shokralla and Steven van Konyenburg

**Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol**

Shadi Shokralla, Gregory A. C. Singer, and Mehrdad Hajibabaei  
*Biodiversity Institute of Ontario, Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada*

*Bio Techniques* 48:XXX-XXX (March 2010) doi 10.2144/000113362

RESOURCE ARTICLE

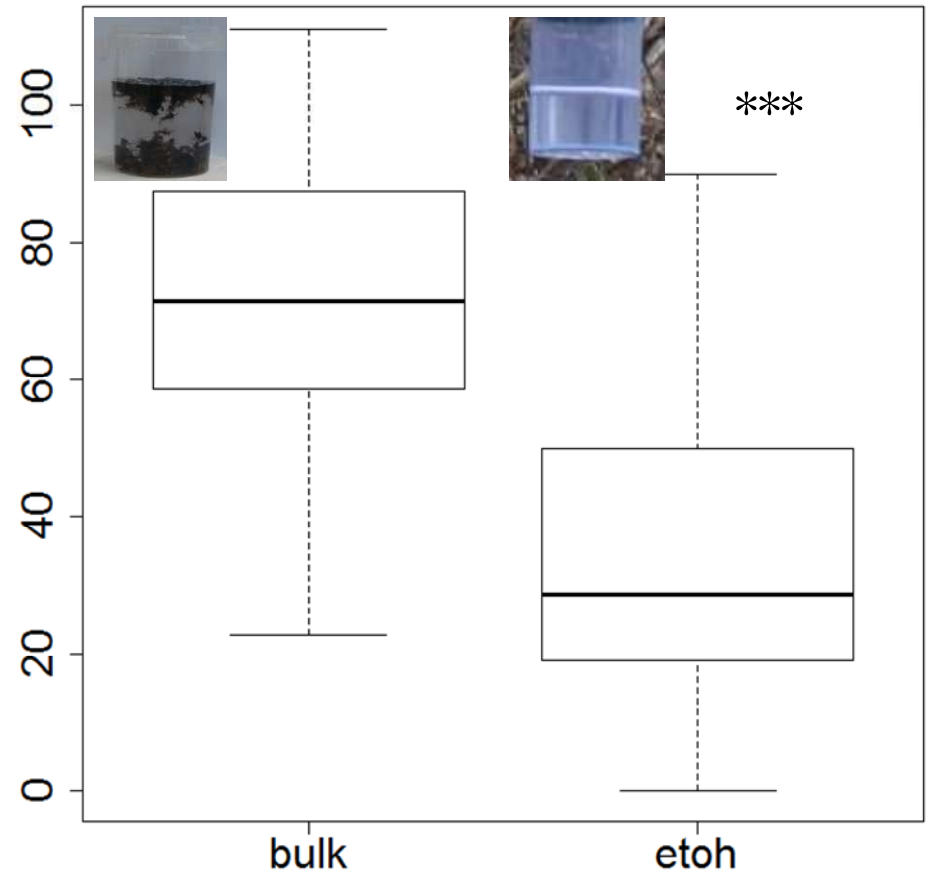


Establishing arthropod community composition using metabarcoding: Surprising inconsistencies between soil samples and preservative ethanol and homogenate from Malaise trap catches

Daniel Marquina<sup>1,2</sup> | Rodrigo Esparza-Salas<sup>1</sup> | Tomas Roslin<sup>3,4</sup> | Fredrik Ronquist<sup>1</sup>



Faible taux de détection avec l'ADN extrait dans l'alcool de stockage



Rougerie, Bouget, Lopez-Vaamonde et al., unpubl.

**Limite 10**



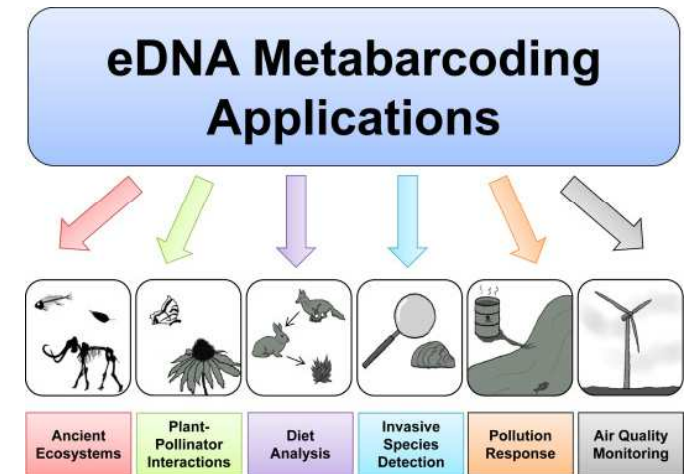
# Identification taxinomique automatique à haut débit : bilan

Des applications variées

Une opportunité pour les suivis de biodiversité, un bilan encore mitigé

D'autres pistes ?

- Détection sonore
- Reconnaissance visuelle autonome



<https://nanoporetech.com/products/minion>

2019 = 1,000\$



French Barcode Of Life

Merci de votre attention !