

Des empreintes biologiques dans l'environnement (ADNe) : enjeux pour la santé animale

L'identification par séquençage d'ADNe* (environnemental)

L'identification des espèces par séquençage d'acide désoxyribonucléique ADN (*barcoding**, fig. 1) est devenue un outil indispensable depuis sa création en 2003 [1]. Les techniques récentes de séquençage massif (plusieurs millions de séquences par étude) ont ouvert la voie à l'identification des communautés d'espèces (fig. 2) présentes dans un échantillon environnemental [2]. Les nouvelles techniques de séquençages ont drastiquement diminué le prix du séquençage (fig. 3a) et augmenté la taille des bases de données de références (fig. 3a) depuis leur apparition vers 2008.

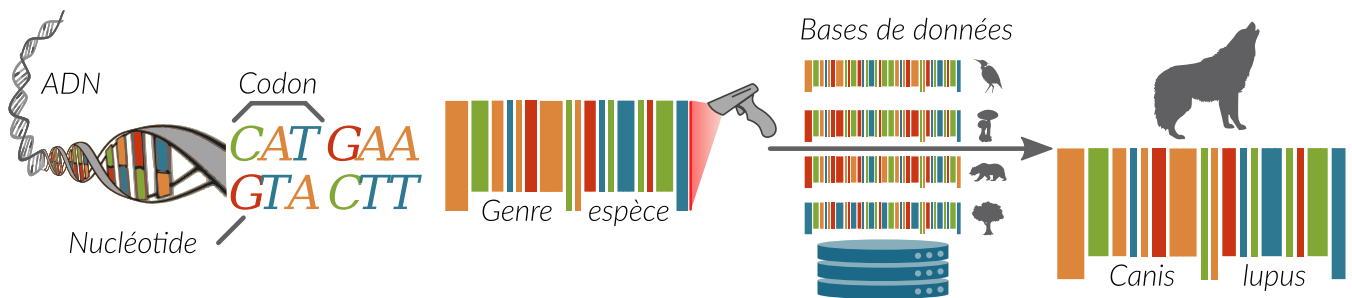


Fig. 1 : L'identification des espèces par séquençage d'ADNe repose sur la variabilité des nucléotides et la comparaison de ces séquences avec des bases de données.

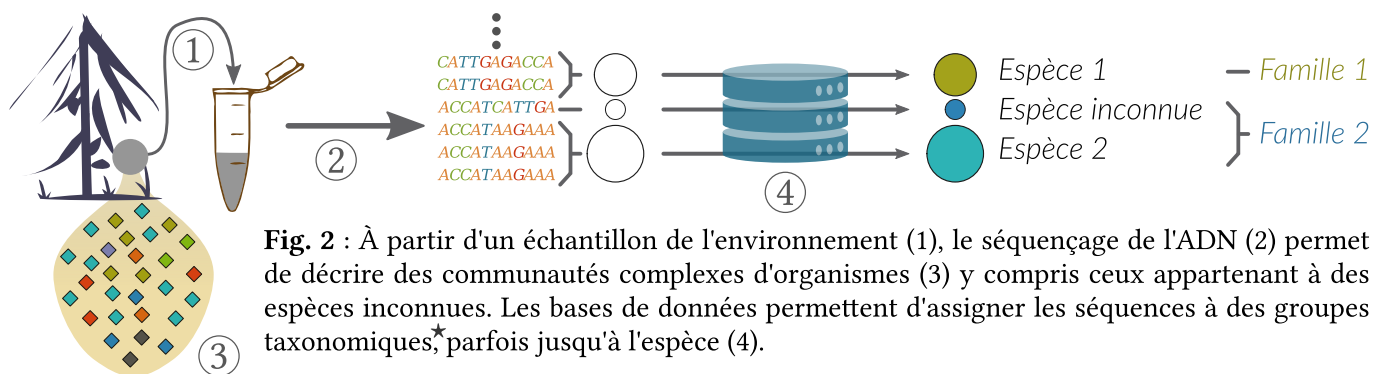


Fig. 2 : À partir d'un échantillon de l'environnement (1), le séquençage de l'ADN (2) permet de décrire des communautés complexes d'organismes (3) y compris ceux appartenant à des espèces inconnues. Les bases de données permettent d'assigner les séquences à des groupes taxonomiques*, parfois jusqu'à l'espèce (4).

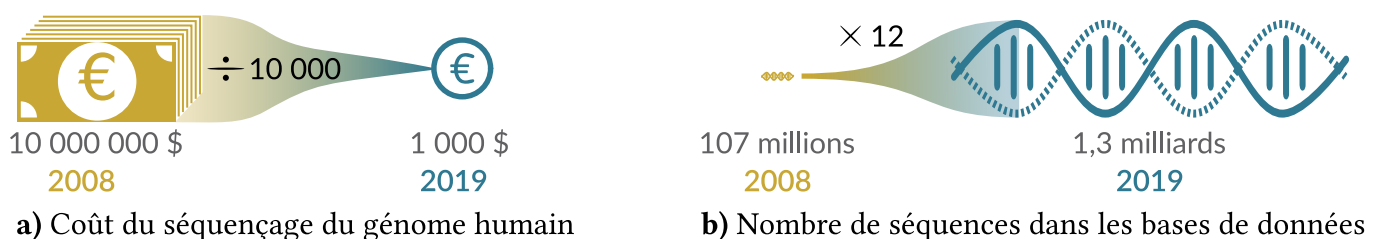


Fig. 3 : Évolution entre 2008 et 2019 **a)** du coût du séquençage des 3,3 milliards de nucléotides du génome humain [a], **b)** du nombre de séquences dans les bases de données de références (*GenBank* et *WGS* [b]).

Exemples d'usages de l'identification par séquençage d'ADNe

Le séquençage d'ADNe permet :

- de mieux comprendre la biodiversité, en particulier pour les organismes furtifs ou microscopiques (*par ex. identifier les poissons d'un lac ou les bactéries d'un sol forestier [3]*),
- d'améliorer la santé humaine (*par ex. contrôler le risque microbien alimentaire [4], mieux connaître le microbiote intestinal [5] ou l'écologie des pathogènes humains [6]*),
- de lutter contre la fraude alimentaire et médicale (*par ex. identifier les ingrédients présents dans un aliment [7]*),



Les étapes d'un projet d'ADNe

Étapes

Détails des étapes



Questionnement et hypothèses

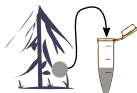
Par ex. : *Quelles sont les espèces pathogènes présentes dans un élevage ? Quels facteurs sont responsables de leur présence ?*



Préparation de l'étude

- Identifications des *méthodes de séquençage et statistiques*
- Conception du *plan d'échantillonnage*

Choix de la région du génome à séquencer (et des amorces associées) en fonction des groupes taxonomiques étudiés et de la précision souhaitée pour l'identification. Prendre en compte la perte de certains échantillons aux cours des étapes suivantes (prendre au moins 10% d'échantillons en plus).



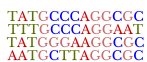
Échantillonnage

Faire attention aux **contaminations*** par de l'ADN après échantillonnage (*par ex. utiliser du matériel à usage unique*).



Extraction & amplification* d'ADN

Choix du kit d'extraction. Nécessite du matériel particulier et un environnement très contrôlé (*par ex. laboratoire exempt d'ADN contaminant*).



Séquençage

Choix de la plateforme de séquençage en fonction des questions et des paramètres techniques (*coût, nombre de séquences par échantillon, longueur de la région génomique ...*)

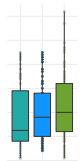
Analyses des résultats

- *Vérification de la qualité*
- **Regroupement en OTUs*** et assignations *taxonomiques* (*par ex. identification des espèces*)

Tri des échantillons et des séquences de **mauvaises qualités** et analyse des contrôles négatifs et positifs.



Pour trouver du sens parmi les millions de séquences, on les **regroupe en espèces moléculaires** appelées OTUs. On compare les séquences de ces groupes avec des bases de données pour **déterminer leur classification** dans le monde vivant (*par ex. la famille, le genre, parfois l'espèce*).



- *Analyses descriptives*

Les analyses de ces millions de séquences peuvent **améliorer nos connaissances** et **soulever de nouvelles questions**, indépendamment de nos questions initiales.



- *Analyses détaillées pour répondre aux questions et tester des hypothèses*

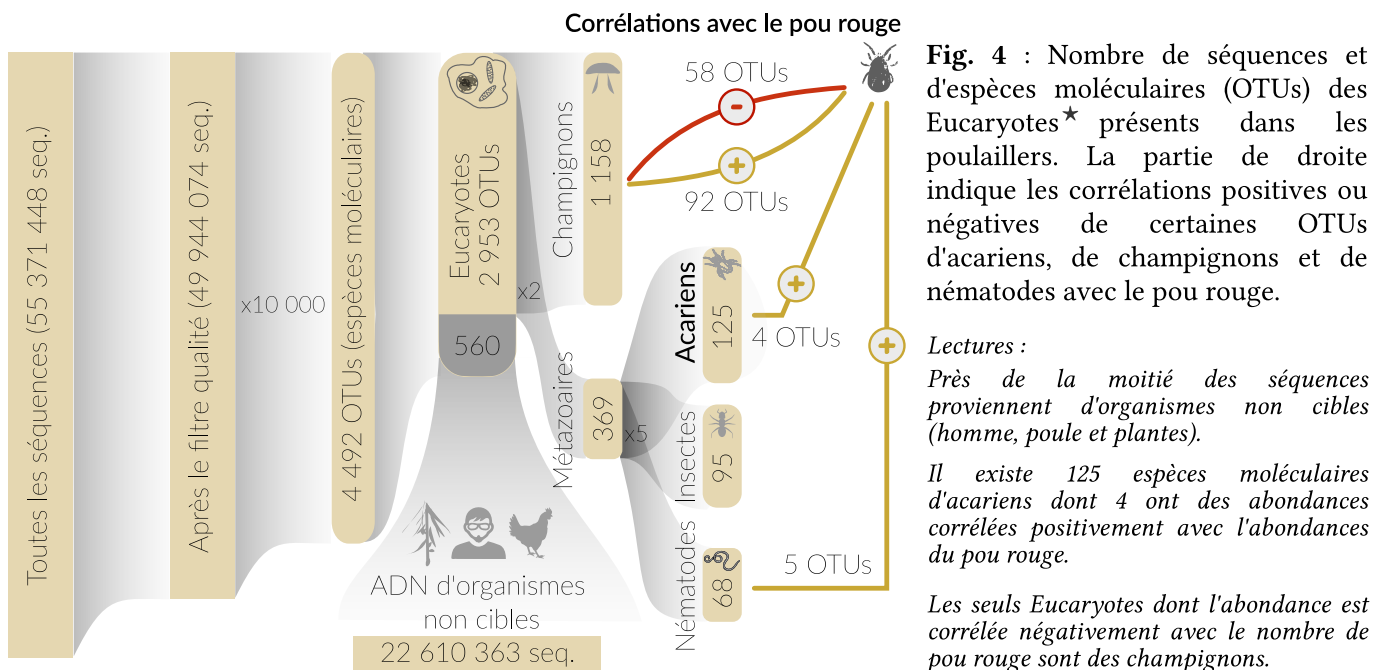
Les analyses statistiques associées aux tests d'hypothèses permettent de **répondre aux questions initiales**, et d'avancer dans la compréhension du système d'étude.

Quelles utilisations de l'ADNe en santé animale?

La détection et l'identification des espèces par séquençage d'ADNe est d'ores et déjà un outil pertinent pour les **professionnels et les chercheurs qui s'intéressent à la santé animale**. Le développement des technologies et des outils d'analyses vont accroître l'utilité du séquençage d'ADNe pour (i) **connaître la diversité** d'êtres vivants présents dans les élevages, (ii) **surveiller les organismes pathogènes** pour l'homme et l'animal, (iii) **identifier des espèces pourvoyeuses de services** pour l'éleveur (voir encadré ci-dessous), ou encore (iv) **mesurer les effets des pratiques** d'élevages sur la biodiversité.

Le **pou rouge des poules** (*Dermanyssus gallinae*) est un parasite important des élevages de poules et une excellente cible de la **lutte biologique**. L'idée est de favoriser les prédateurs/parasites du pou rouge naturellement présents dans les poulaillers en agissant sur les pratiques d'élevages. Afin d'identifier ces espèces qui régulent les populations de pou rouge, le projet BIOPTIPOU a **séquéncé l'ADNe** présent dans l'air des poulaillers (voir exemple ci-dessous).

Un exemple d'application : mieux connaître le pou rouge des poules



Dans le cadre du projet de recherche BIOPTIPOU, une analyse d'ADNe a permis de décrire la communauté des organismes vivants Eucaryotes de plusieurs poulaillers (fig. 4).

- Des comptages visuels de certaines espèces d'acariens ont validé la méthode d'analyse d'ADNe comme un outil d'avenir pour décrire les communautés vivants dans les élevages.
- Le pou rouge des poules est impliqué dans des réseaux d'interactions complexes qu'il est difficile de démêler avec les techniques d'ADNe.
- Les pratiques agricoles (conventionnel, plein air, agriculture biologique) ont peu d'effet sur la biodiversité.

Avantages de l'identification par ADNe

- Rend détectable des espèces invisibles, peu abondantes à un coût relativement faible ;
- Un seul échantillonnage permet l'étude d'une grande diversité d'organismes et de questions ;
- Permet de décrire des communautés d'êtres vivants en interaction localement.

Dans l'étude BIOPTIPOU, une seule analyse a permis à la fois (i) de décrire les communautés fongiques potentiellement pathogènes pour le pou rouge et (ii) de tester l'effets des pratiques d'élevages sur l'abondance des acariens dans les poulaillers.

Inconvénients de l'identification par ADNe

- Le coût de séquençage est relativement faible (fig. 3a) mais l'analyse peut être plus coûteuse ;
- On ne sait pas encore très bien estimer la quantité réelle d'organismes à partir des décomptes de séquences et l'absence de détection ne garantit pas l'absence de l'espèce. Enfin, l'ADN présent peut provenir d'un organisme mort.

Dans l'étude BIOPTIPOU, le nombre de séquences ne reflète que partiellement l'abondance des acariens. De plus, certains acariens identifiés visuellement sont absents de l'ADNe.

★ GLOSSAIRE ★

ADN environnemental : ensemble de l'ADN présent dans un échantillon de l'environnement sans isolement d'individu(s) cible(s).

Barcoding : identification biologique grâce au séquençage d'une courte séquence d'ADN (appelée marqueurs) et sa comparaison à une base de données.

Contamination : apparition d'ADN dans un échantillon environnemental après son échantillonnage. Par exemple, présence d'ADN humain apporté lors des étapes d'amplification et d'extraction de l'ADN.

Eucaryotes : ensemble des êtres vivants ayant un noyau dans leur cellule. Correspond à tous les êtres vivants à l'exclusion des bactéries (Eubactéries et Archéobactéries).

Extraction et amplification : pour séquencer l'ADN présent dans un échantillon, il faut d'abord l'extraire de l'échantillon, c'est à dire ne conserver que l'ADN et éliminer toutes les autres molécules. La grande majorité des techniques de séquençage nécessitent ensuite une étape de multiplication des séquences appelée amplification.

Groupe taxonomique : ensemble des organismes vivants partageant un ancêtre commun. Chaque organisme vivant fait partie de plusieurs groupes taxonomiques imbriqués (par ex. la famille, l'espèce).

Marqueur moléculaire : courte séquence d'ADN qui permet l'identification biologique par barcoding

OTU : Abréviations de l'anglais *Operational taxonomic Unit*. Une OTU correspond à une espèce d'un point de vue moléculaire. Il s'agit d'une définition opérationnelle qui permet de grouper des séquences d'ADN proches sans faire d'hypothèse d'interfécondité.

Sources

a/ National Human Genome Research Institute (<https://www.genome.gov/sequencingcosts>)

b/ Genebank + WGS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>)

Références

- 1/ Hebert *et al.* 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]*
- 2/ Valentini *et al.* 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.*
- 3/ Deiner *et al.* 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol.*
- 4/ Grütze *et al.* 2019. Fishing in the soup - Pathogen detection in food safety using metabarcoding and metagenomic sequencing. *Front. Microbiol.*
- 5/ Clemente *et al.* 2012. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*
- 6/ Sato *et al.* 2019. Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. *Scientific reports*
- 7/ Bruno *et al.* 2019. Food tracking perspective: DNA metabarcoding to identify plant composition in complex and processed food products. *Genes*

BIOPTIPOU



Rédaction, mise en page et création graphique : Adrien Taudière (<https://adrientaudiere.com>) - Relecture : Lise Roy, Geoffrey Chiron

Financement : projet Bioptipou (<https://tinyurl.com/bioptipou>)