Inventaire moléculaire des métazoaires souterrains (aquatiques)

Tristan Lefébure & Florian Malard

LEHNA, Univ. Lyon 1, CNRS, ENTPE

Université Claude Bernard Lyon 1

Florian MALARD[1],
Héloïse VERDIER[1],
Lara KONECNY-DUPRÉ[1],
David EME[2-3],
Christophe J. DOUADY[1]
et Tristan LEFÉBURE[1]

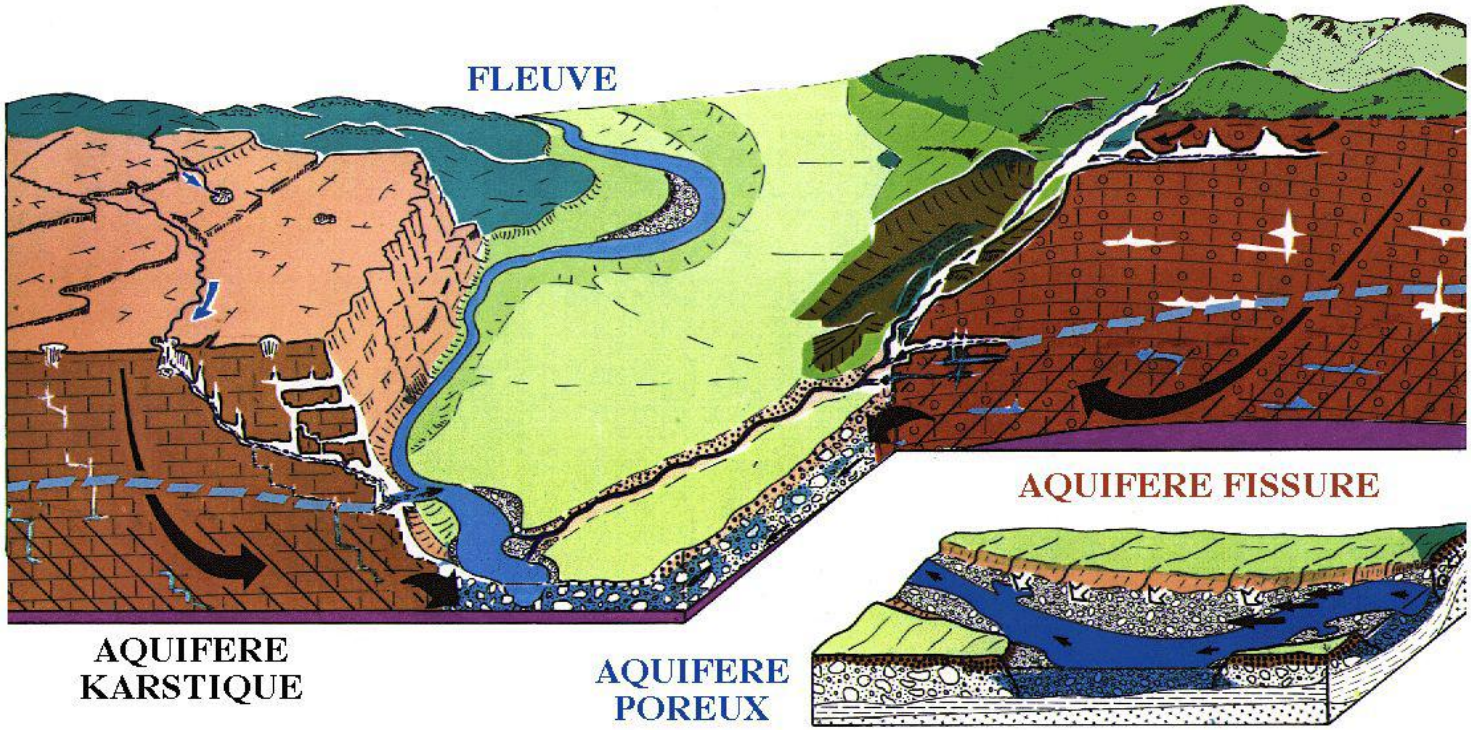
(1) Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France
(2) IFREMER Centre Atlantique, Unité Écologie et Modèles pour l'Halieutique, rue de l'Île d'Yeu, Nantes, 44980, France
(3) RiverLY Research Unit, National Research Institute for Agriculture Food and Environment (INRAE), Villeurbanne, France

Subterranean species inventory in the molecular era

Inventaire des espèces souterraines dans l'ère moléculaire

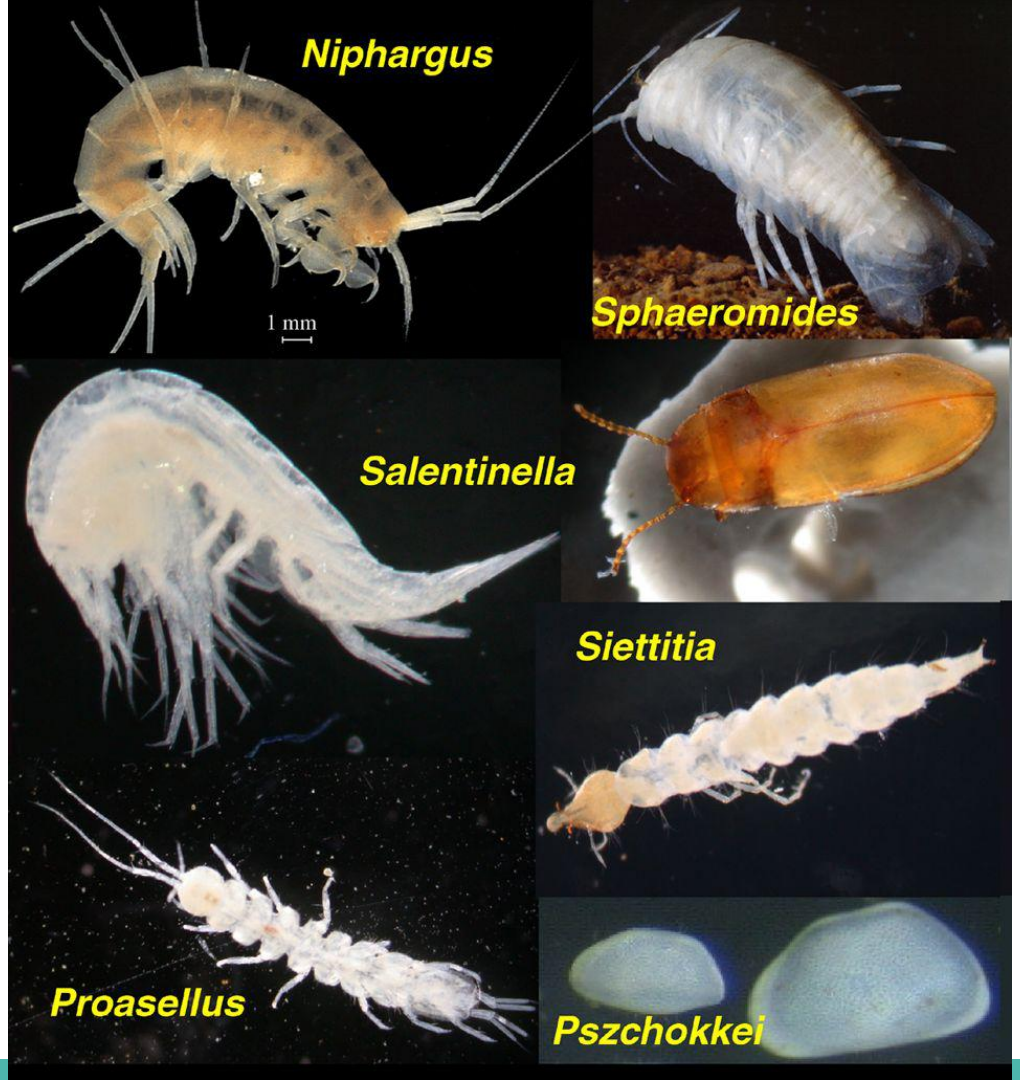
KARSTOLOGIA n° 79, 2022 • 73-78

Les milieux souterrains ?



Biodiversité souterraine aquatique

Organisme souterrain obligatoire

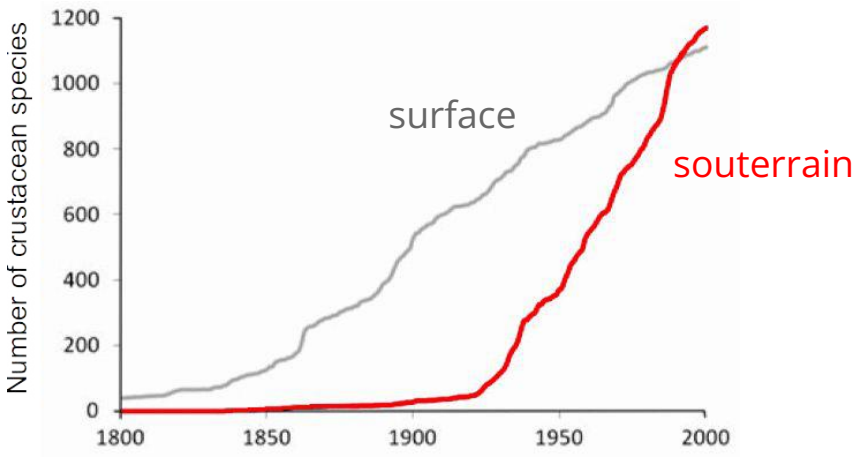


Échantillonnage classique

Chasse, appât, substrat, filtration, pompage…

Un hotspot de biodiversité (en crustacés)

- des groupes ultra-diversifiés (plus qu'en surface)
- un inventaire en cours

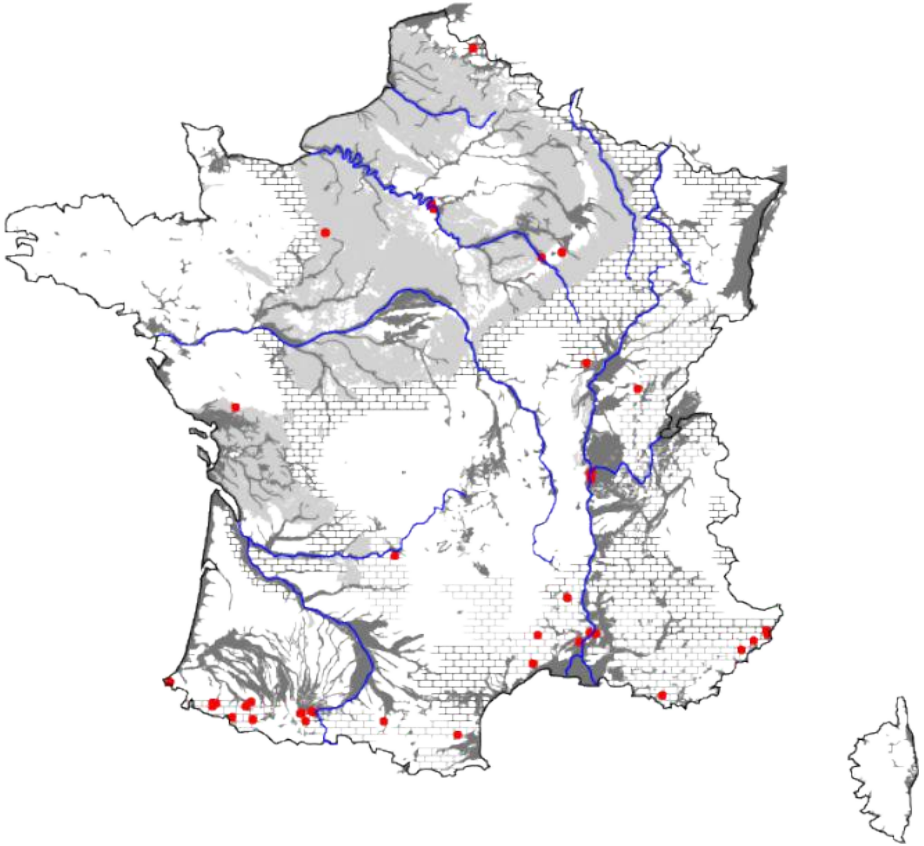


Stoch & Galassi 2010 Hydrobiologia

La biodiversité aquatique souterraine en France

:

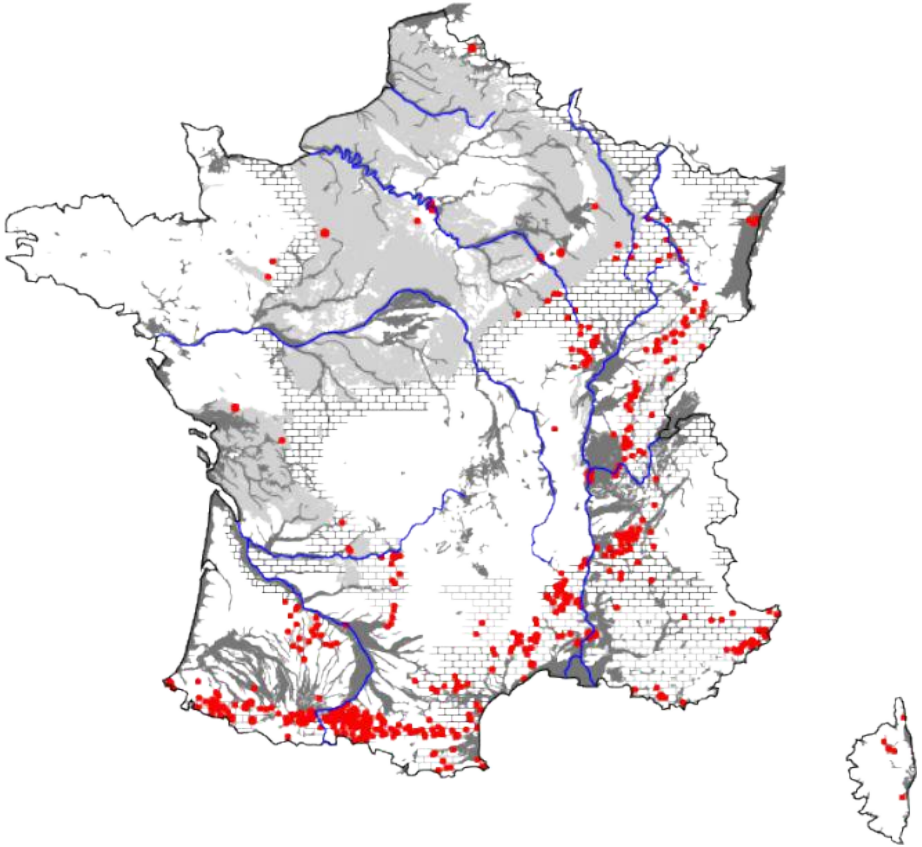
1907



La biodiversité aquatique souterraine en France

:

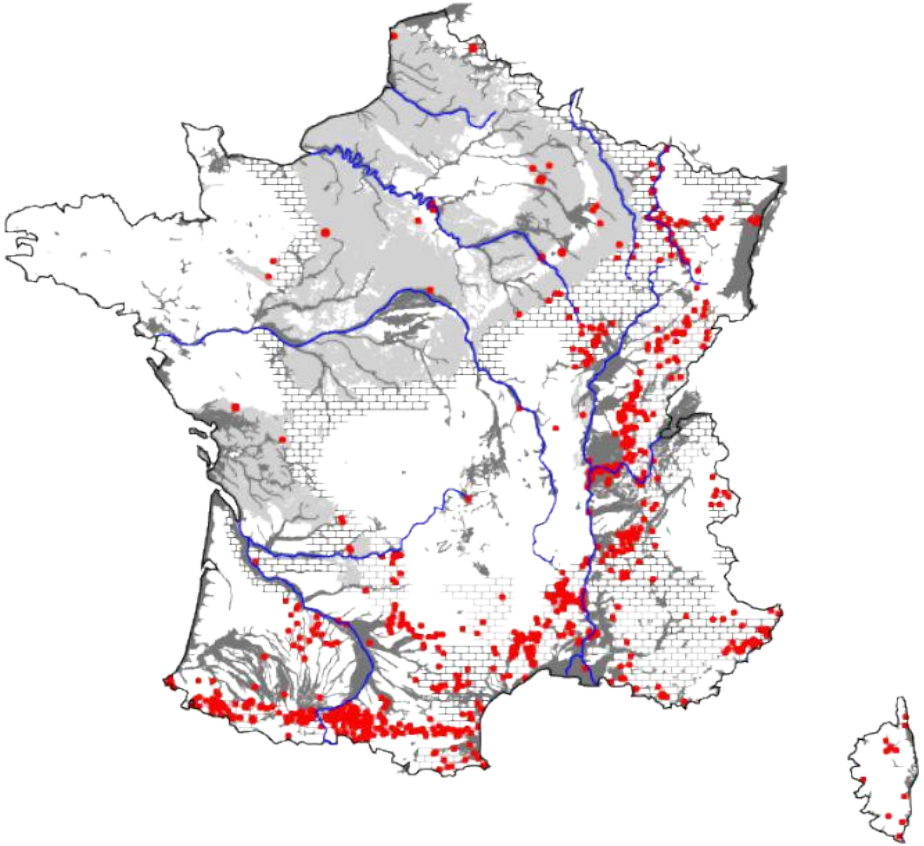
1960



La biodiversité aquatique souterraine en France

:

2003



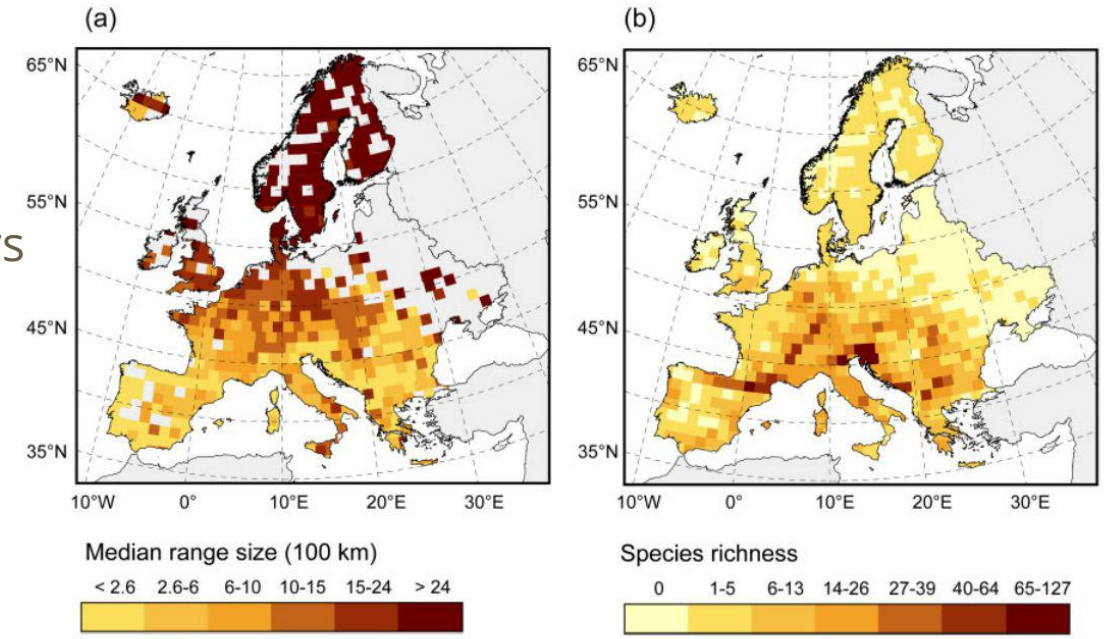
Bilan des connaissances (partielles)

⇒ En Europe, une **crête de biodiversité** et un fort **effet latitudinal sur les aires de répartitions**

⇒ Manque de connaissance hors europe (Afrique, Asie, Amérique du Sud)

Des freins importants à la constitution d'inventaire:

- Accès difficile
- Endémisme
- Diversité cachée

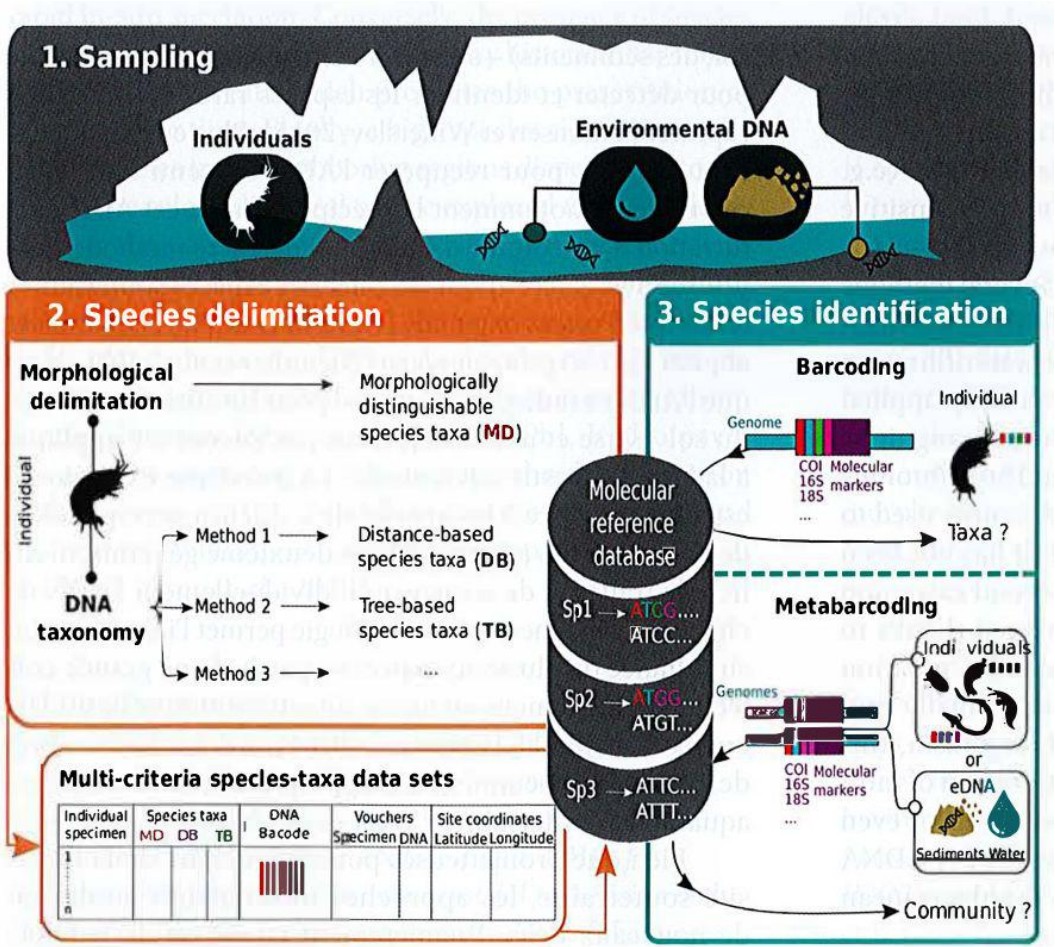


Zagmajster et al 2014 GEB

L'aire moléculaire

Impact majeur sur:

- **1. Délimitation d'espèce**
- **2. Identification**
- **3. Echantillonnage**

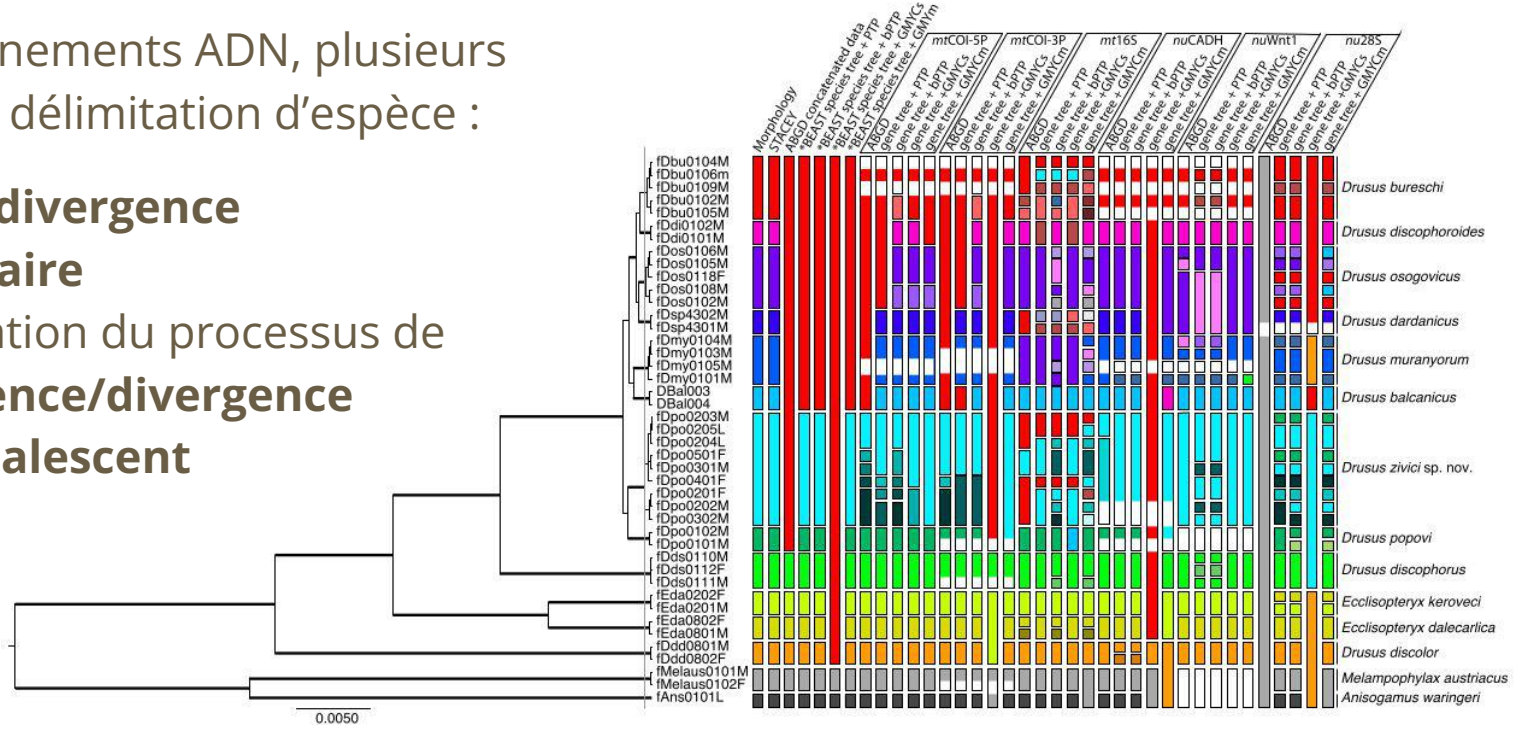


Malard et al 2022 Karstologia

1. Taxonomie moléculaire - délimitation moléculaire

A partir d'alignements ADN, plusieurs méthodes de délimitation d'espèce :

- Seuil de **divergence moléculaire**
- Modélisation du processus de **coalescence/divergence**
- **Multi-coalescent**



Exemple chez des trichoptères, Vitecek et al 2017 BMC EvolBiol

Quel impact sur notre vision de la biodiversité souterraine ?

Plusieurs types de conflits possible entre délimitations:

- match
- lump
- split
- reshuffling

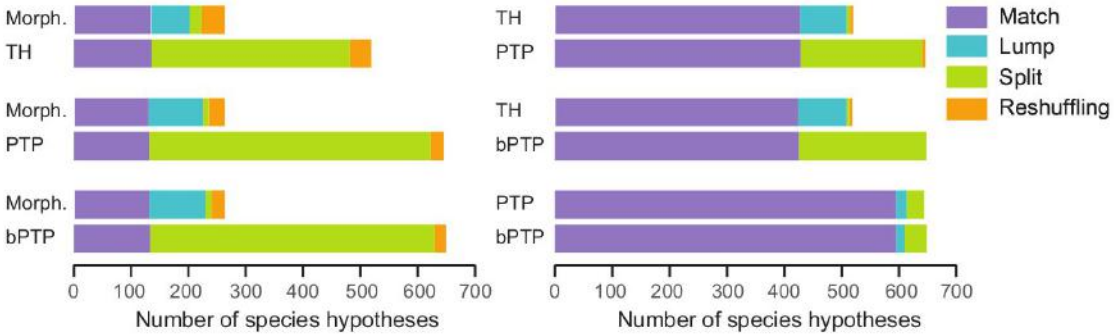


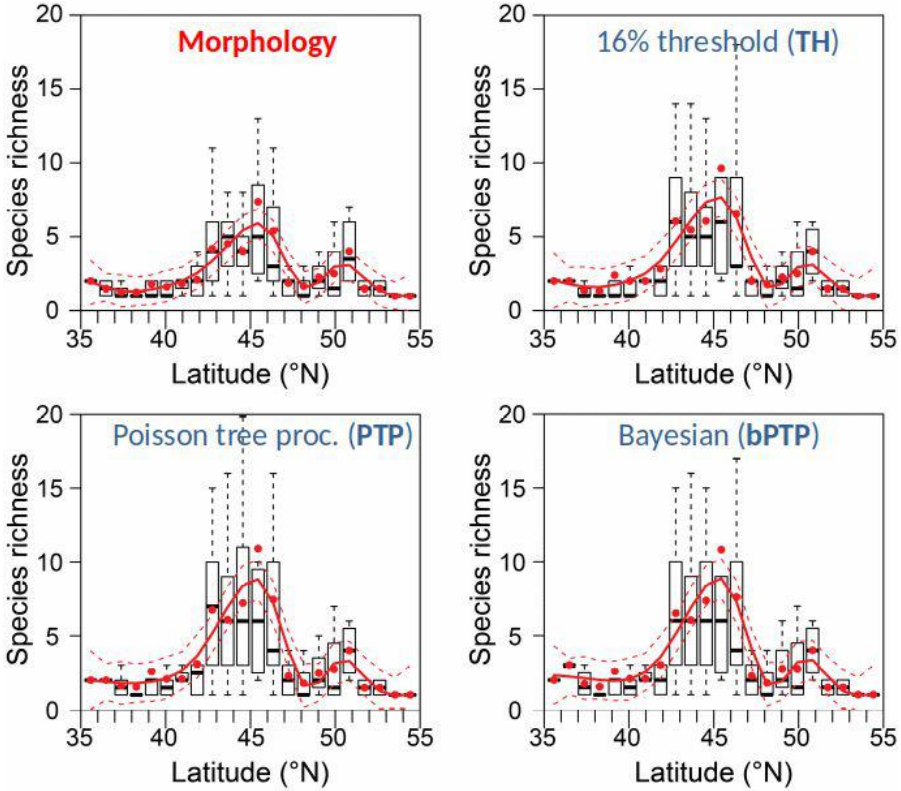
Figure 2. Pairwise taxonomic comparisons between the four different sets of species hypotheses delimited using morphology (Morph.), a COI divergence threshold (TH), the Poisson tree processes model (PTP) and its Bayesian implementation (bPTP). See text and Fig. 1 for definitions of match, lump, split and reshuffling.

⇒ Augmentation de la diversité par redécoupage d'unité pré-existante

Eme et al 2018 Ecography

Quel impact sur notre vision de la biodiversité souterraine ?

Species delimitation criteria	Number of putative species	Average range size of species (MLE in km ± standard deviation)
Morphology	263	170 ±316
16% divergence threshold (TH)	519	41 ±136
Poisson tree processes (PTP)	646	22 ±96
Bayesian implementation (bPTP)	650	17 ±63

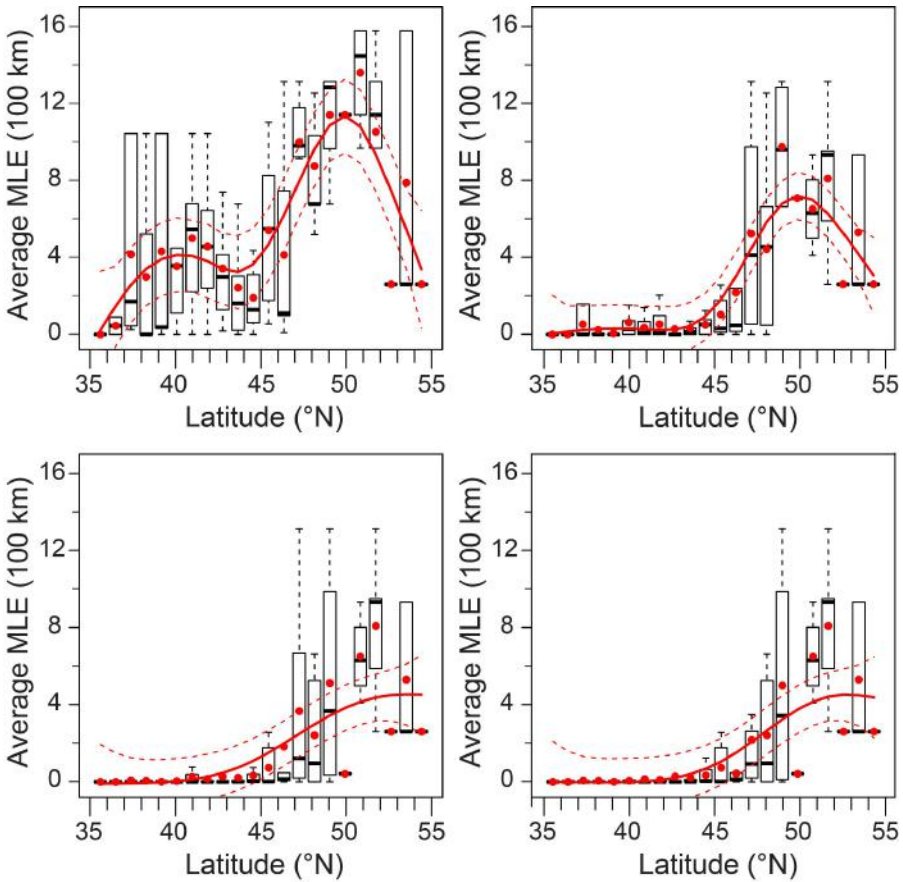


- un fort effet sur la diversité
- mais pas d'effet sur les patrons de diversité

Eme et al 2018 Ecography

Quel impact sur notre vision de la biodiversité souterraine ?

- une accentuation de l'endémicité

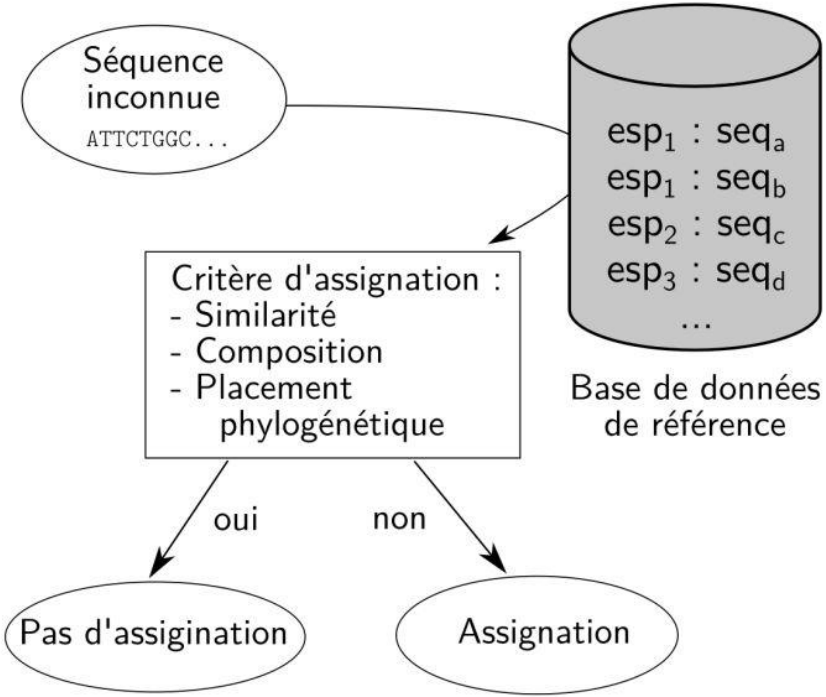


Eme et al 2018 Ecography

2. Barcoding de la biodiversité souterraine

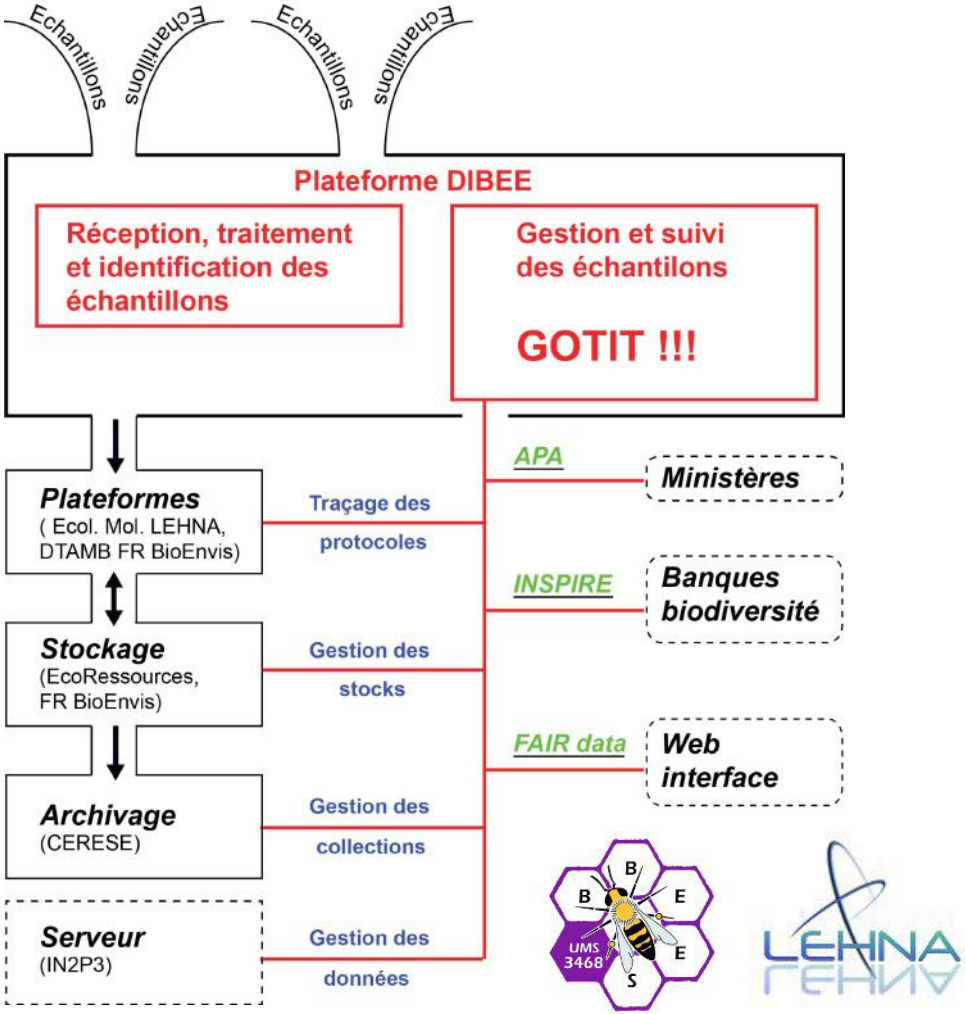
Principe:

1. Echantillonnage d'un organisme
2. Extraction ADN
3. Amplification par PCR d'un barcode
4. Séquençage Sanger
5. Assignation taxonomique



Des milliers de barcodes…

La base de données GOTIT



https://github.com/GOTIT-DEV/GOTIT

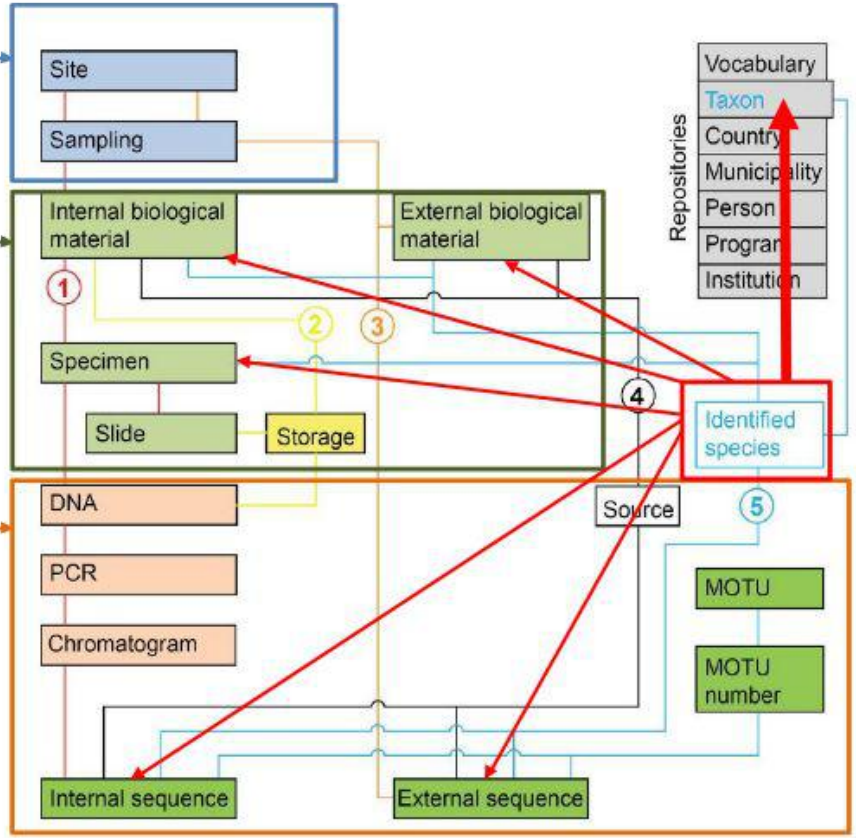
Malard F et al MEE

GOTIT: Une bdd

Données de terrain
{Station, Collecte}

Etudes morphologiques
{Lot matériel, Individu, Lame}
{Lot matériel externe }

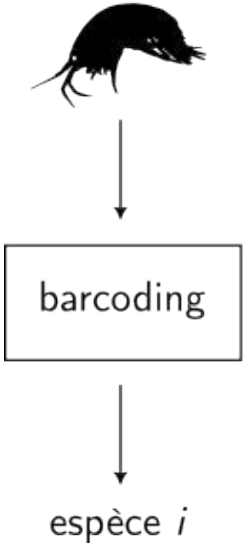
Etudes biologiques
{ADN, PCR, Chromatogramme, séquence assemblée, MOTUs}
{séquence assemblée externe}

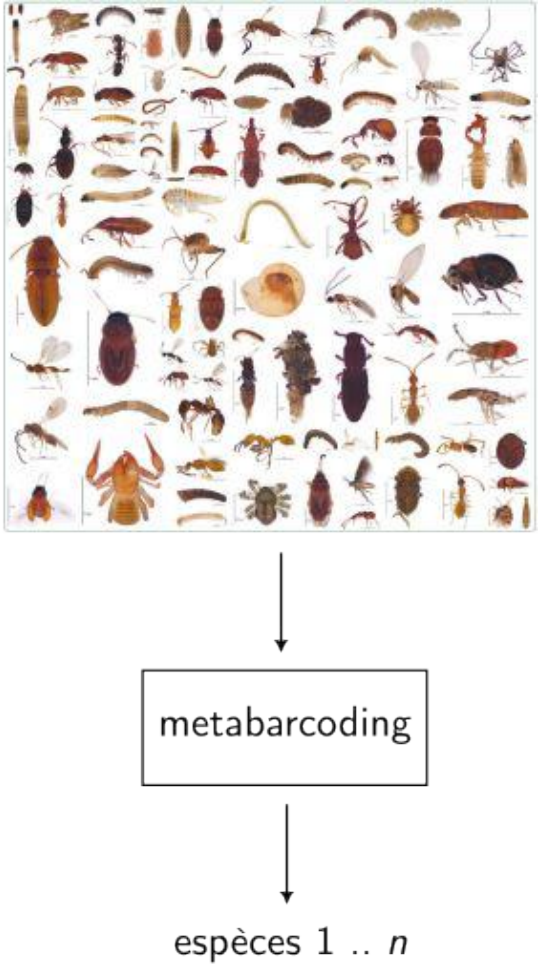


GOTIT: et une interface web

du barcoding vers le metabarcoding

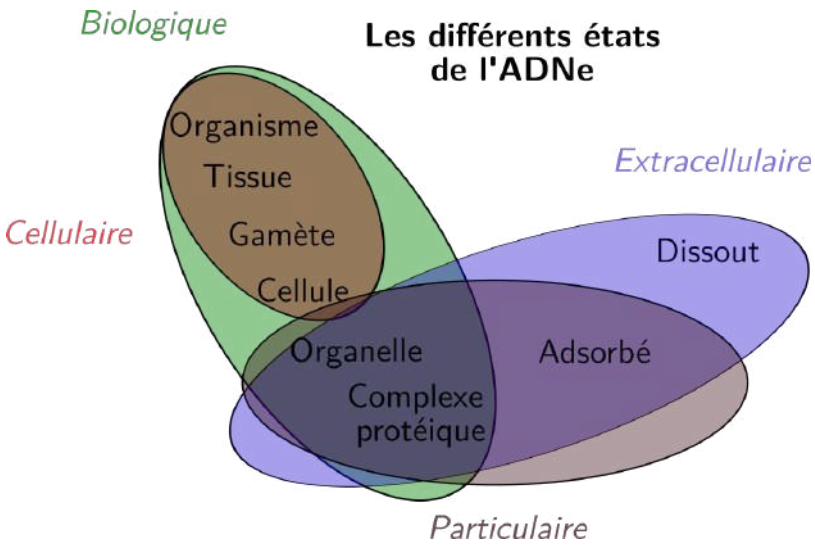
- parallélisation du barcoding
- identification moléculaire en masse d'échantillons
- applicable à différentes matrices (bulk, ADNe)





3. Echantillonnage d'ADN environnementaux

Sens strict: ADN extra-organisme



Matrices à ADNe

Classiquement :

- Eau filtré
- Sédiments

Une multitude de questions/challenges:

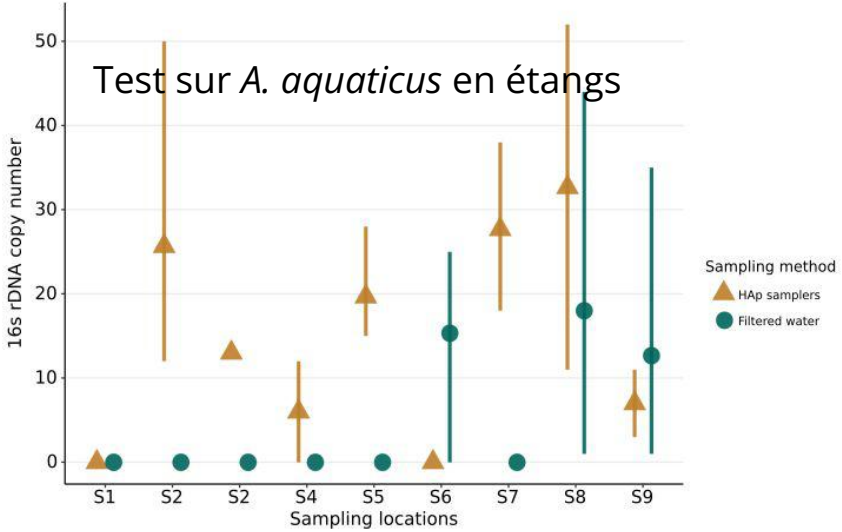
- origine des ADNe
- qualité du signal
- ....

Cartouche EnviroDNA

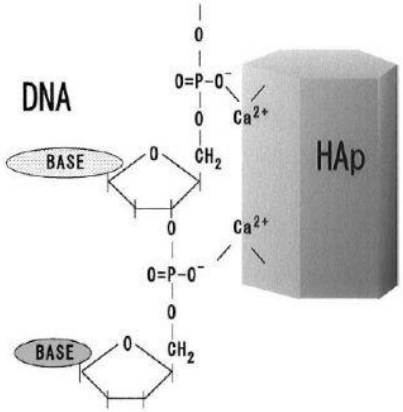
Échantillonnage de la biodiversité souterraine par ADNe

Développement de capteur passif en hydroxyapatite imprimé en 3D

- intégratif
- réutilisable
- simple à utiliser (science participative)



Verdier et al 2022 MER



3d.FAB | ICBMS LYON

Les ADNe souterrains

Quelques études isolées :

- Détection par qPCR:
  - protée
  - Stygobromus
  - Cambarus
  - Anguille et divers poissons souterrains

- Métabarcoding du karst d'une île tropicale, karts australiens, karst iranien…

⇒ **Pas de protocol standardisé, pas de recul**

Goricki et am 2017 ScRep, PLoS One; Neimiller et al 2018 ConsGenetRes; West et al 2020 SciRep; Boyd et al 2020 PloSOne; White et al 2020 Hydobiologia; Oberprieler et al 2021 SciTotEnv; Segherloo et al 2021 eDNA; review in Sacco 2022 SciTotEnv)

Défis

Découvrir leur ADN avant les organismes ?

⇒ Construire des bases de données moléculaire ouvertes pour tous les taxons souterrains

Comment développer des protocoles de biologie moléculaire non-biaisés pour une faune inconnue ?

⇒ biais de PCR

Les approches ADNe sont-elles fiables en milieu souterrain ?

⇒ Analyse pilote